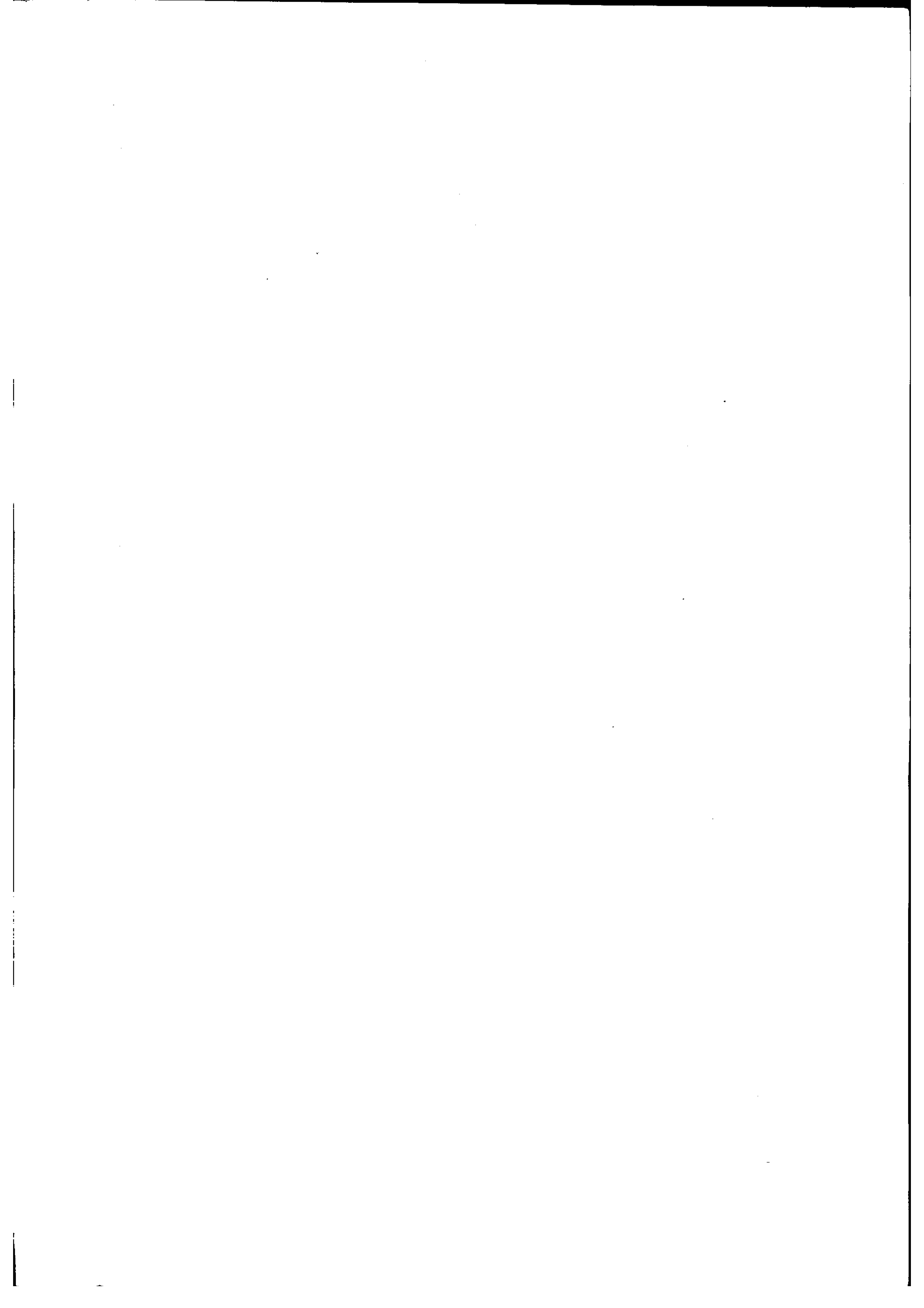
الكائنات الدقيقة.... عمليًا



الكائنات الدقيقة.... عمليًّا

تأليـــف

هارى و . سيلى (الابن)
جامعة كورنيل

بول ج. فان ديمارك
جامعة كورنيل

ترجمـــة

دكتور عبد الوهاب محمد عبد الحافظ
أستاذ الميكروبيوجيا
وعميد كلية الزراعة جامعة عين شمس

دكتور محمد الصاوى محمد مبارك
أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا
كلية الزراعة جامعة عين شمس

مراجعـــة

دكتور سعد على زكى محمود
أستاذ الميكروبيولوجيا المتفرغ
عميد كلية الزراعة جامعة عين شمس سابقاً


الدار العربية للنشر والتوزيع

MICROBES IN ACTION
A LABORATORY MANUAL OF MICROBIOLOGY
THIRD EDITION

First published in the United states
by
W.H. Freeman and company, New york and Oxford

ISBN O — 7167-1259-8
456789 WC 108987654

الطبعة العربية :

• حقوق النشر
الطبعة الأجنبية

الكائنات الدقيقة ... عمليًا
الطبعة الأولى ١٩٨٩

ISBN 977 - 1475 - 32 - 0

١٧ش نادى الصيد بالدقى ـــ القاهرة
ت : ٧١٨٠٠٦ ـــ ٨٣٧١٩٦

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربيه فى بلادنا يومًا بعد يوم ، ولاشك أنه فى الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها ، ولا ريب فى أن إذلال لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقاف وفكرى للأمة نفسها ، الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالًا ونساءً ، طلابًا وطالبات ، علماء ومثقفين ، مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغه عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم ؛ لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت — فيما مضى — علوم الأمم الأخرى ، وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية ؛ فكانت لغة العلوم والآداب ، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة .

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به دول أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى . فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب . ولم ينكر الأوروبيون ذلك ، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق ، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلم والتدريس والتأليف ، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم ، وأن غيرها ليس بأدق منها ، ولا أقدر على التعبير . ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار التركى ، ثم البريطانى والفرنسى ، عاق اللغة من النمو والتطور ، وأبعدها عن العلم والحضارة ، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير ، وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة ، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء والعلماء فى إنماء اللغة وتطويرها ، حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة ، والجامعة الأمريكية فى بيروت درَّستا الطب بالعربية أول إنشائهما . ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيها باللغة العربية لوجدناها كتبًا ممتازة لا تقل جودة عن أمثالها من كتب الغرب فى ذلك الحين ، سواء فى الطبع ، أو حسن التعبير ، أو براعة الإيضاح ، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد ، وسادت لغة المستعمز ، وفرضت على أبناء الأمة فرضًا ، إذ رأى الأجنبى أن فى خنق اللغة مجالًا لعرقلة تقدم الأمة العربية . وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها ، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه ، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتسابًا لمرضاته ، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة ، يشككون فى قدرة اللغة العربية على استيعاب الحضارة الجديدة ، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر : « علموا لغتنا وانشروها حتى تحكم الجزائر ، فإذا حَكمت لغتنا الجزائر ، فقد حكمناها حقيقة . »

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر — فى أسرع وقت ممكن — إلى اتخاذ التدابير ، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام ، والمهنى ، والجامعى ، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الاطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم . وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب ، نظراً لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى ، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية ، ويُرتفع بمستواه العلمى ، وذلك يعتبر تأصيلًا للفكر العلمى فى البلاد ، وتمكيناً للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع ، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم .

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متباطئة ، أو تكاد تتوقف ، بل تُحارب أحيانًا ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات ، ممن ترك الاستعمار فى نفوسهم عُقدًا وأمراضًا ، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية ، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد على خمسة عشر مليون يهوديًا ، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول ، واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآداب والتقنية ، كاليابان ، وإسبانيا ، ودول أمريكا اللاتينية ، ولم تشكك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة ، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها ؟!

وأخيرًا .. وتمشيًا مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع ، وتحقيقًا لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى ، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة ، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحدًا من ضمن ما نشرته - وستقوم بنشره - الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة .

وبهذا ... ننفذ عهدًا قطعناه على المُضِىّ قُدُمًا فيما أردناه من خدمة لغة الوحى ، وفيما أراده الله تعالى لنا من جهاد فيها .

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم **﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُه والمؤمنون ، وستُرَدّون إلى عالِمِ الغيب والشَّهَادَة فَيُنبئكم بما كُنْتُم تَعْمَلون ﴾** .

محمد دربالة

الدار العربية للنشر والتوزيع

مقدمة المترجمين

من المعروف أن الكائنات الحية الدقيقة تعيش فى كل مكان ، وتلعب دورًا رئيسيًّا فى حياتنا ، وأغلبها غير ضار ، وكثيرها نافع ، وقليلها ضار .

ويتعرض الكتاب – الذى بين أيدينا – لتوضيح التدريبات المعملية المتعلقة بدراسة الميكروبات ، وطرق التعرف عليها ، ومتابعة نشاطها فى نواحى الحياة المختلفة ، وذلك لفهم وتداول تلك الأحياء الدقيقة .

ويتضمن الكتاب ، فى أبوابه الستة عشر الكثير ، من التدريبات العملية سواء الخاصة بالميكروبيولوجيا الأساسية ، أو بمجالاتها التطبيقية المختلفة ، موضحة بالأشكال والرسوم والصور ، بالإضافة إلى ذلك ، فالكتاب مذيل بتركيب الأصباغ ، والمحاليل والبيئات ، وكذلك التقارير الخاصة بكل تدريب ، مع قائمة بالمصطلحات العلمية التى وردت بالكتاب .

وقد اهتم المؤلفان ، بتبسيط وتسهيل العرض ، فى تسلسل متدرج ، مع تقديم علمى مبسط فى بداية كل تدريب ، لتسهل على القارئ متابعة الموضوع . وقد حرص المؤلفان على إضافة التجارب الجديدة الخاصة بالأحياء الدقيقة – بالإضافة إلى التجارب المعملية التقليدية – حتى يتمكن القارئ من مسايرة التطورات الحديثة .

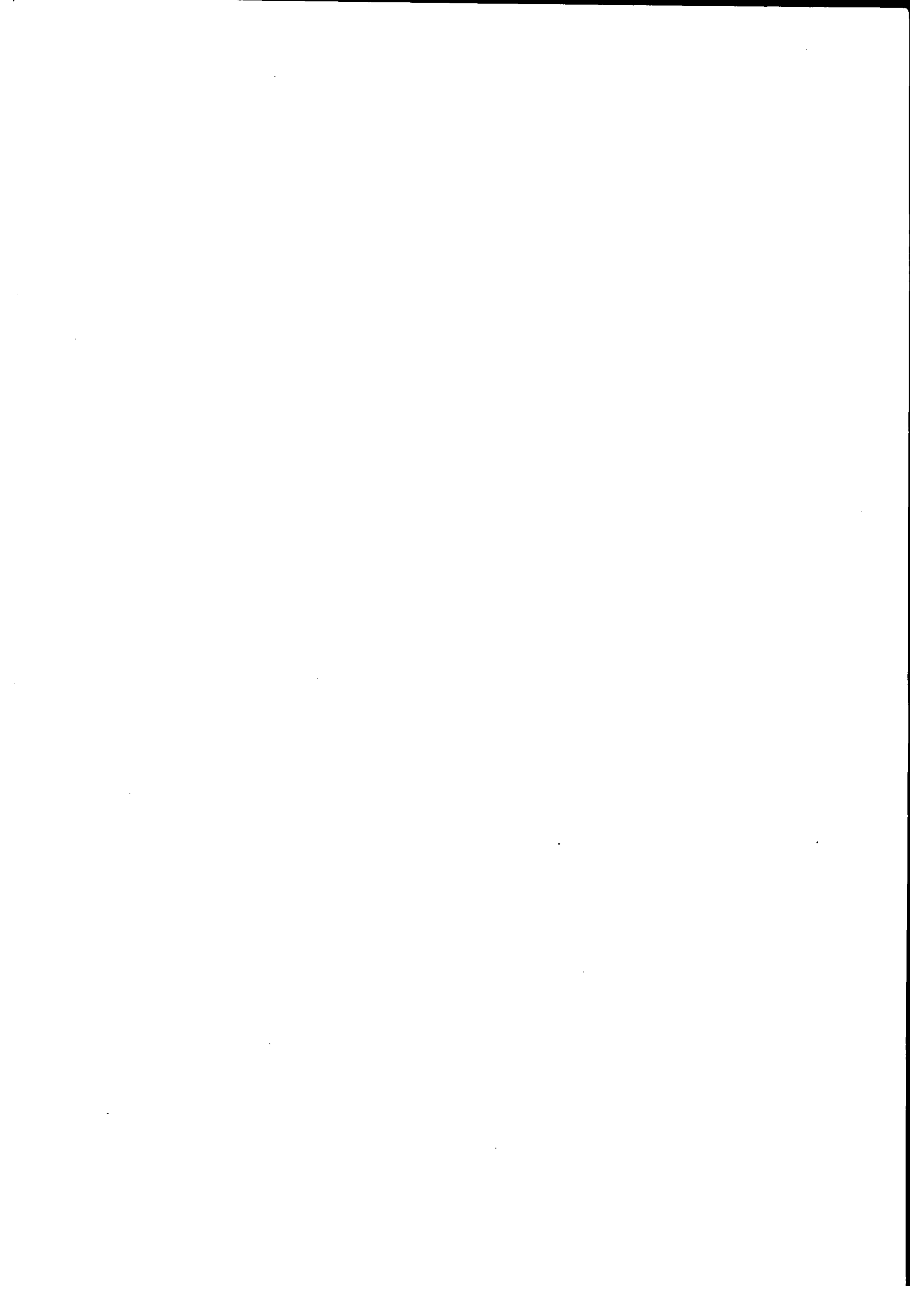
وفى كل ذلك .. فقد راعى المؤلفان تصميم التجارب العملية بعناية ، حتى لا يتعرض القائم بالعمل ، للميكروبات المرضية والكيميائيات الخطرة .

ونعتقد أن هذا الكتاب ، نموذج ناجح للكتب العملية ، التى تعالج مثل هذه الموضوعات الهامة ، فى نمط جيد ، وأسلوب مبسط ، تمكن القائم بإجراء التدريبات ، من أن يستفيد منه استفادة محققة .

وإننا إذا نقدم هذا الكتاب العملى لطلبة المعاهد العلمية المختلفة ، ولكل العاملين فى مجال الميكروبيولوجى ، نتمنى أن يحقق لهم الفائدة المرجوة ، بما يعود عليهم وعلى وطننا بالخير والتوفيق .

والله نسأل أن يسدد خطانا

القاهرة فى يناير ١٩٨٩ **المترجمان**



مقـــدمـــة

فى السنوات الأخيرة .. نمت علوم قليلة مثل الميكروبيولوجى وتغيرت بسرعة ، لذلك فإن هذه الطبعة من كتاب «الكائنـات الدقيقـة ... عمليًـا» Microbes in action تضمنت التجارب المعملية التى تمكن الطالب من مسايرة ما تم من تطورات حديثة .

يعتمد التقدم الواسع فى علم الميكروبيولوجى والمجالات المرتبطة به على المعلومات الأساسية الخاصة بالكائنات الحية الدقيقة . لذلك فإننا مازلنا فى هذه الطبعة من الكتاب ، نواصل التأكيد على الطرق التقليدية مثل : طرق التعقيم ، والمزارع الانتقائية ، ومزارع الإكثار . وهدفنا الرئيسى من ذلك هو توفير التدريب الأساسى اللازم لفهم وتداول الكائنات الحية الدقيقة .

وبإدخال تمارين جديدة فى مجالات مثل : الوراثة الميكروبية ، والفيرولوجى ، والمناعة ، فإننا نهدف إلى الوصول بهذا الكتاب لأحدث ما تم التوصل إليه ، كما نهدف إلى إعداد الطالب للقيام بأعمال أخرى أكثر امتداداً فى هذه المجالات .

وفى هذا الكتاب – وكما حدث أيضا فى الطبعات السابقة – فإننا نركز على الدراسات البيئية ، بمعنى أننا نؤكد على العلاقات الطبيعية بين الكائنات والوسط المحيط بها . ولزيادة التأكيد على هذا الاتجاه .. فإن تمارين جديدة أُضيفت مثل : عزل وتعريف أنواع ممثلة لمختلف المجاميع البكتيرية ، وعمود فينوجرادسكى ، وتحليل الهواء لما يحويه من ميكروبات .

فقد راعينا عند إضافة هذه التمارين الجديدة والتمارين الأخرى المعقدة أنه يمكن عمليًّا القيام بها وتكرارها بالمقرر المعملى . وقد تبين أن تلك التمارين يمكن إجراؤها عندما أدرجت ضمن مفردات الدروس العملية وتم بنجاح القيام بها خلال فترة امتدت لعدة فصول دراسية .

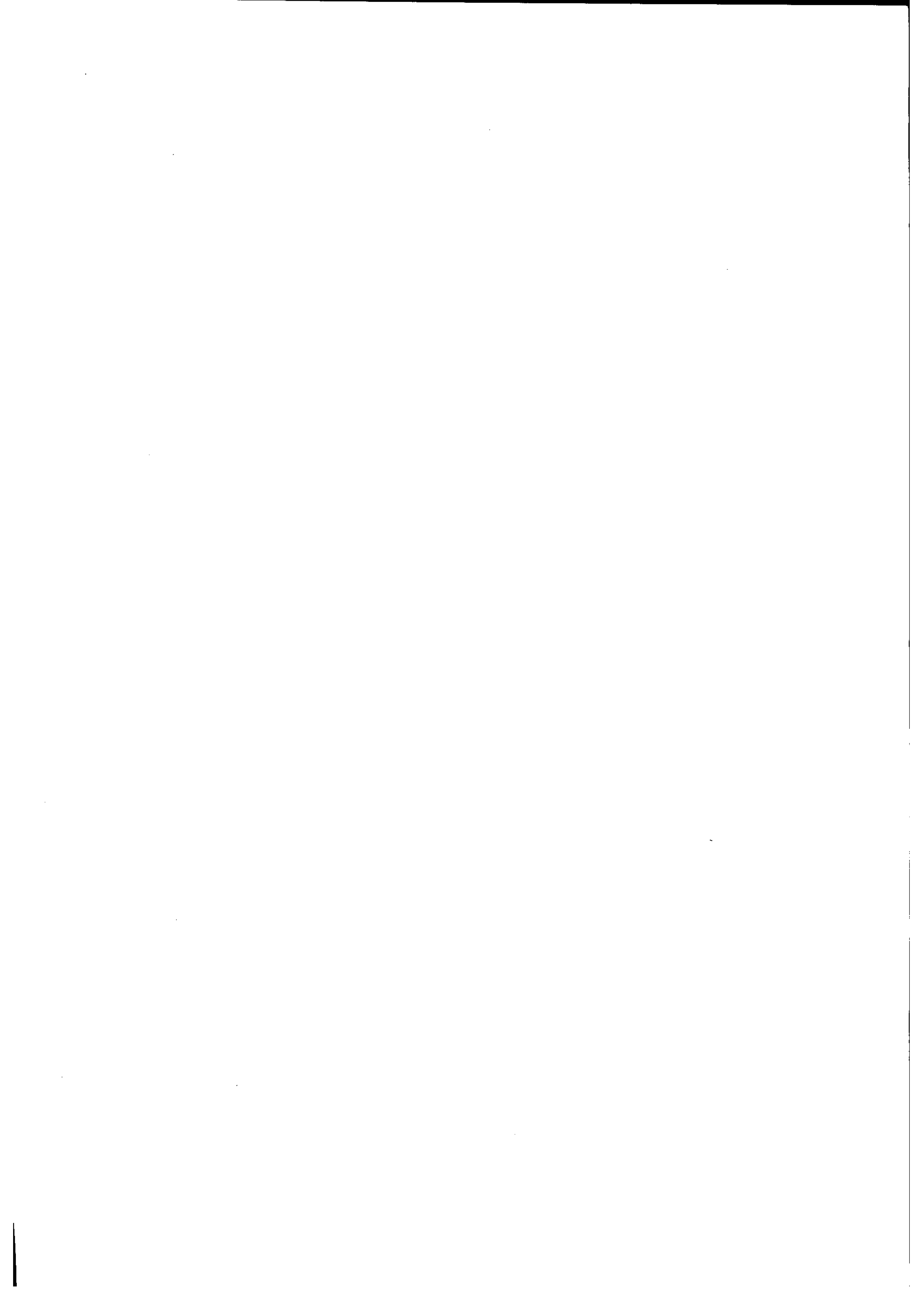
وعند تصميم التمارين ، اخترنا بعناية المزراع الميكروبية وراعينا الشروط التى تقلل من تعرض الطالب للميكروبات المرضية والكيميائيات الخطرة . وقد دفعنا الاهتمام المتزايد المتعلق بتأثير كثير من الكيميائيات على صحة الإنسان ، إلى استبعاد طرق معينة ، وبعض المحاليل من التمارين ، كما فى حالة استعمال البيروجالول فى التنمية اللاهوائية للبكتيريا – وعندما دعت الضرورة إلى استعمال مثل هذه المزارع الميكروبية ، أو الكيميائيات الخطرة ، فقد تم التأكيد على الطالب والمشرف على المعمل ، باتخاذ الاحتياطات اللازمة لمواجهة الأخطار المحتملة .

وأخيراً فإننا عميقو الامتنان للمشرفين ، والطلبة ، والعاملين فى فصولنا الدراسية خلال سنوات طويلة ، الذين كانت انجازاتهم ضرورية لتطوير هذا الكتاب . كما أننا مدينون بصفة خاصة لكارول ريهكوجلر ، ولندا فلينتون ، وروزالى ماكدرميد لقيامهم بعمل التعديلات ، والتصميمات لكثير من التمارين ، التى أُضيفت ، بغير حدود لعمل مقرر هام ومؤثر للتدريب المعملى . كما أننا نتوجه بالشكر إلى مارى كرليسل لطباعتها الممتازة من المنسوخ اليدوى لهذا الكتاب .

هارى و . سيلى (الابن)
بول ج . فان ديمارك

نوفمبر ١٩٨٠

المحتـــويات



(اقتراحات ، وإرشادات)

SUGGESTIONS AND REGULATIONS

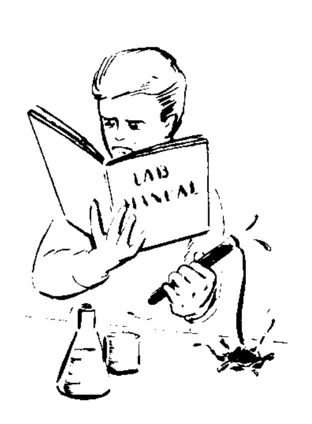
مقترحات ، ومعلومات عامة

General Suggestions and Information

١ – ارتد معطفاً ، أو بالطو ، أو مريلة لحماية ملابسك .



٢ – قبل بداية كل فترة معملية ، اقرأ التدريب الذى ستؤديه ، وضع خطة جيدة للعمل ، اعرف كيف سيتم العمل لكل تمرين والأهداف الأساسية المطلوب التوصل إليها .



٣ – يبدأ كل درس عملى بمناقشة قصيرة وتلقى التعليمات – لاتبدأ العمل قبل أن تتلقى التعليمات اللازمة ، اسأل إذا لم تفهم الطريقة ، أو الهدف من كل تمرين ، فجودة أدائك بالمعمل تعتمد أساسًا على معرفتك الجيدة لما ستقوم به .

٤ – من الأنسب أن تدون ملاحظاتك ومشاهداتك وقت حدوثها ، وستغطى الامتحانات المعلومات التى أعطيت لك أثناء المعمل والتى حصلت عليها من هذا الكتاب بالإضافة إلى ما توصلت إليه بنفسك من ملاحظات واستنتاجات . اجب على الأسئلة الموجودة فى نهاية كل تمرين فى ورقة التقرير المعد لذلك .

إرشادات معملية Laboratory Regulations

١ – امسح بسفنجة مبللة بمحلول قاتل للميكروبات سطح منضدة معملك قبل وبعد كل فترة معملية .



٢ – احتفظ بمنضدتك خالية من المواد غير الضرورية ، وفى نهاية فترة المعمل اترك المنضدة خالية تماما من كل المواد والمعدات .

٣ – ضع كل فضلات المواد الصلبة فى الوعاء الخاص بالفضلات ، والأوانى الزجاجية المتسخة على الصوانى الخاصة بها ، فتقديراتك المعملية ستعتمد على مدى حسن ودقة أدائك المعملى ومراعاتك للنظام والنظافة .

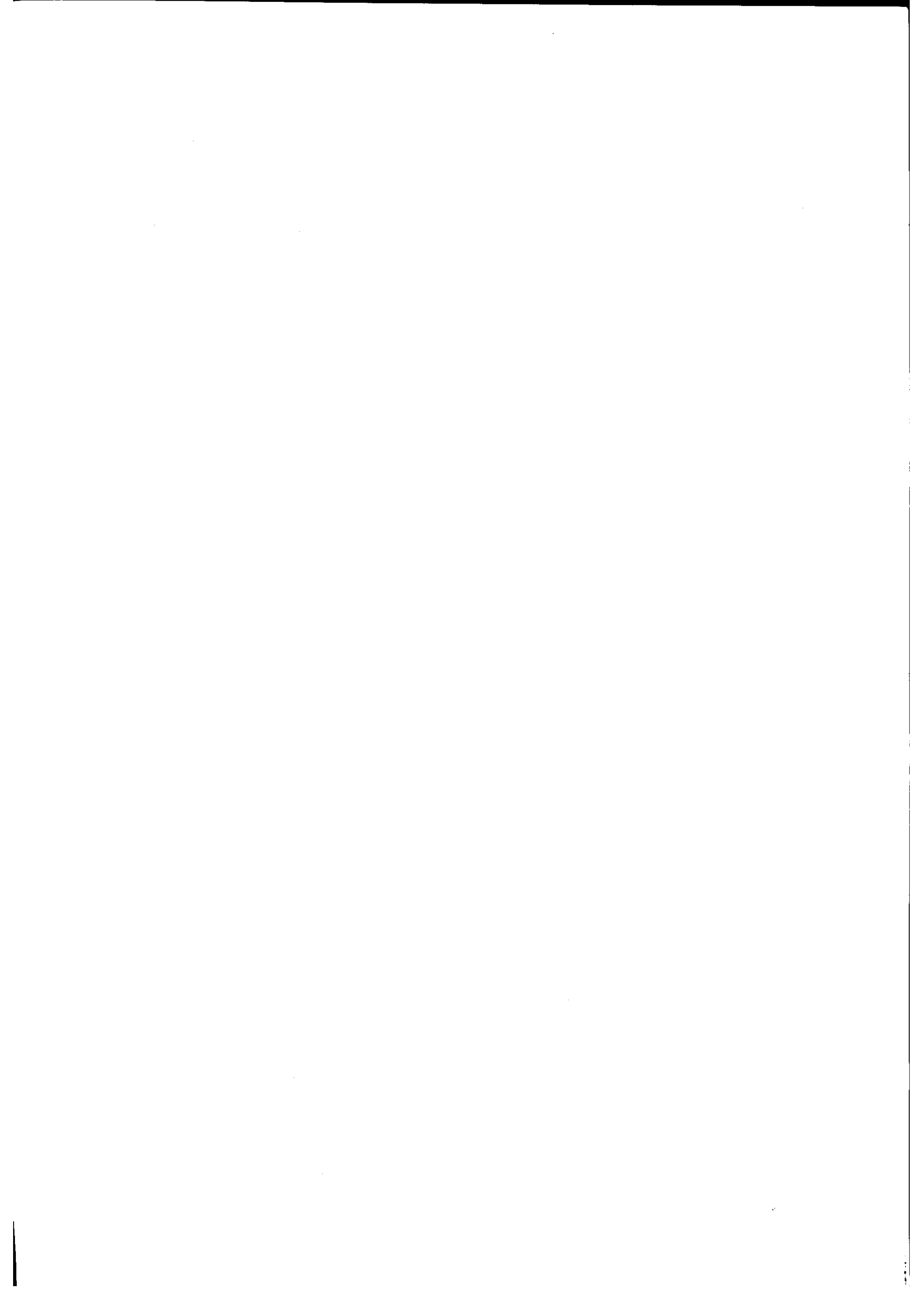
٤ – نظرا لأن الكثير من الكائنات الدقيقة التى ستستخدمها فى التمارين يحتمل أن تكون مسببة للمرض ، فإنه يصبح من المحتم مراعاة شروط التعقيم فى تداول ونقل هذه الكائنات .



٥ - اكتب فى الحال تقريرا للمشرف عما يقع من حوادث ، أو إصابات مثل إصابتك بجرح ، أو خدش ، أو كسر أنبوبة وانسكاب مزرعة - اتخذ كل الاحتياطات لتجنب مثل هذه الحوادث .



٦ - قد تسبب بعض الكيميائيات المستعملة بالمعمل أخطارا إذا لم يتم تداولها بالطريقة الصحيحة ، لذلك اخترنا تجارب يقل فيها استعمال تلك المواد ، غير أنه فى حالة ضرورة استعمال مثل هذه المواد ، تأكد من مراعاة الاحتياطات التى يشير إليها المشرف على الدرس العملى .



الباب الأول

الميكروسكوب

THE MICROSCOPE

يختص علم الميكروبيولوجى بدراسة الكائنات الحية الصغيرة جدًا التى لاتُرى بالعين المجردة ، لذلك فقد بدأ ظهور هذا العلم باكتشاف الميكروسكوب . والميكروسكوب البسيط Simple microscope لا يزيد عن عدسة ثنائية التحدب biconvex lens ، بينما يوجد فى الميكروسكوب المركب Compound microscope نظامان منفصلان من العدسات لتكبير الجزء المفحوص (المرئى Object) ، وبذلك نحصل على تكبير أكبر للمرئى . ونظرا لأن الميكروسكوب المركب هو الأداة الرئيسية فى الفحص الميكروبيولوجى ، لذا فإن الفهم الدقيق لأساس الجهرية والمهارة فى استعمال وتداول هذه الآلة ، يعتبر من المتطلبات الأساسية لأى دراسة تتعلق بعلم الميكروبيولوجى .

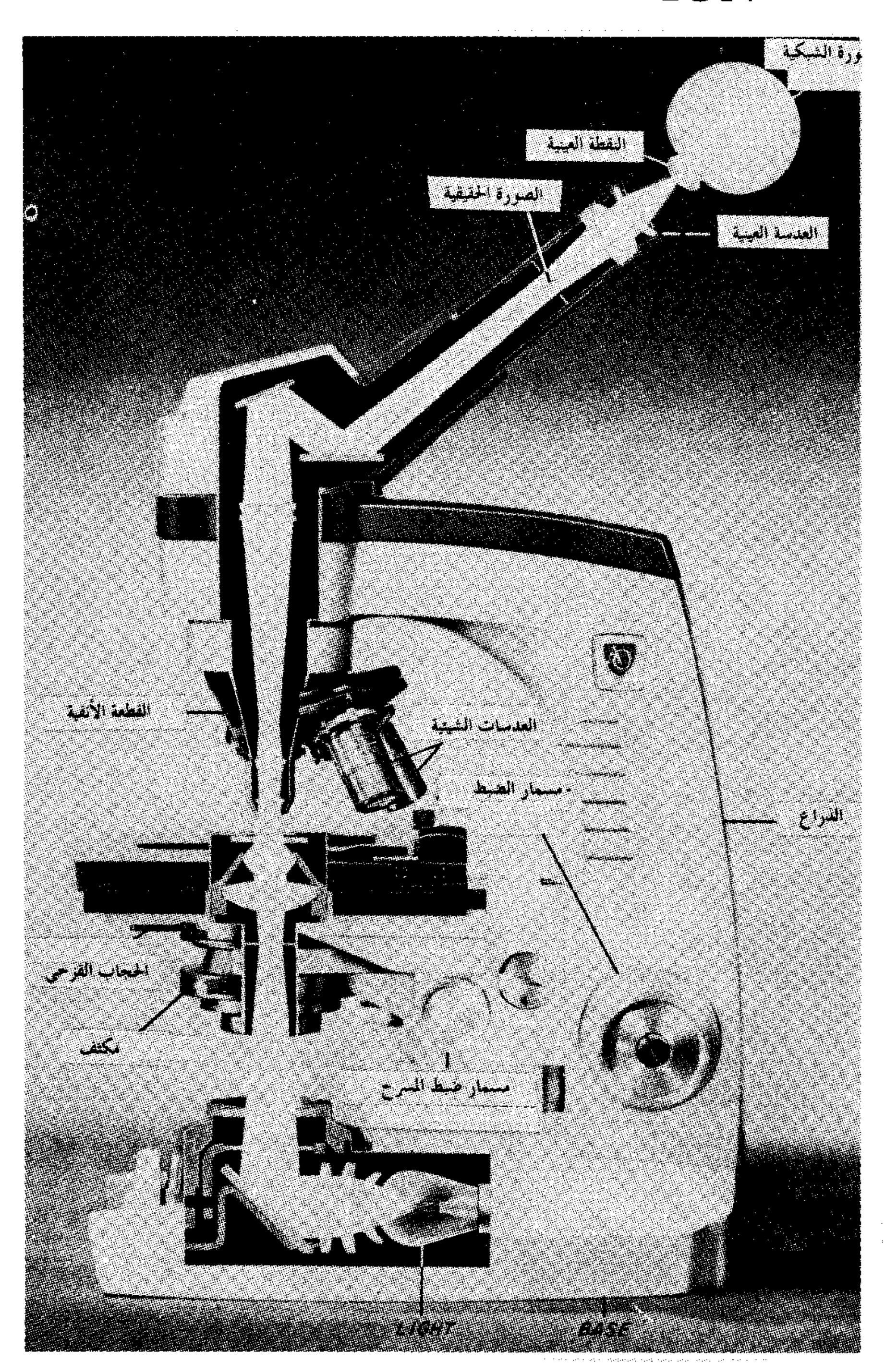
من حيث التفاصيل الخاصة بالتركيب والاستعمال ، فإنه توجد أنواع مختلفة من الميكروسكوبات ، ولكن الأسس واحدة فى كل هذه الأجهزة . فالميكروسكوب أساسا نظام بصرى (للتكبير) ، ونظام إضاءة لجعل العينة المفحوصة مرئية بوضوح - ولفهم طريقة عمل كلا النظامين ، فإنه يجب أن نفهم جيدًا الأسس ، والعلاقات بين كل من التكبير magnification والقدرة التوضيحية Resolving power والإضاءة illumination . أما الميكروسكوب الإليكترونى ؛ فنظرا لأنه يعتمد على أسس فيزيائية مختلفة عن الميكروسكوب الضوئى فإن له القدرة على إعطاء قوة تكبير وقدرة توضيحية أكبر .

التكبير MAGNIFICATION

نحصل على التكبير فى الميكرسكوب المركب ، من خلال عمل نظامين من العدسات (انظر شكل (١ - ١) . العدسات القريبة من العينة المفحوصة تسمى الشيئية Objective ، وهى تكبر المرئى وتكوّن له صورة حقيقية Real image ، والعدسات العينية Ocular القريبة من العين تكبر الصورة الحقيقية الناتجة من الشيئية وتكوّن الصورة التقديرية النهائية virtual image التى ترى بالعين ، وعلى ذلك فإن التكبير الكلى يساوى نواتج تكبير كل من العينية والشيئية .

الميكــروســـــكوب

MICROBES IN ACTION



شكل (١ - ١) : الميكروسكوب المركب (إهداء من الجمعية الأمريكية للبصريات) .

تتركب الشيئية الواحدة من مجموعة من العدسات المحدبة والمقعرة لأنواع مختلفة من الزجاج ، لتصحح العيوب المتعددة التى توجد فى العدسة البسيطة مثل : الزيغ اللونى ، والزيغ الكروى Chromatic and spherical aberrations . ويزود الميكروسكوب المستعمل فى معظم المعامل البكتريولوجية بثلاث شيئيات ذات أبعاد بؤرية مختلفة ، الصغرى low power (١٦ مم) ، الكبرى الجافة high-dry (٤ مم) ، والمنغمسة فى الزيت (الزيتية) oil-immersion (١,٨ مم) . (ويمكن وضع الشيئية المرغوبة فى مكانها المناسب عند الفحص بإدارة القطعة الأنفية Revolving nosepiece التى تتحرك حركة دائرية) . وكما يلاحظ من شكل (١ — ٢) ، فإنه كلما قصر البعد البؤرى للشيئية قصرت مسافة التشغيل working distance وهى : المسافة التى تقع بين المرئى ، والشيئية .

شكل (١ — ٢) : العلاقة بين مسافة تشغيل العدسة الشيئية وضبط الحجاب . كلما قصرت مسافة التشغيل زاد فتح الحجاب .

الحجاب القزحى

(الصورة ناقصة)

تقوم العدسة الشيئية بتجميع الأشعة الضوئية من العينة المفحوصة ، لتكوّن صورة حقيقية مكبرة داخل أنبوبة جسم الميكروسكوب Body tube . وتُكبر هذه الصورة الحقيقية ثانية بواسطة العدسة العينية التى توجد فى الطرف العلوى لأنبوبة السحب Draw tube – تتكون العدسة العينية من عدستين : السفلى وتسمى عدسة المجال Field lens وهى تنقل الصورة الحقيقية الناتجة من الشيئية إلى مستوى البعد البؤرى الأمامى للعدسة العينية العليا المسماة عدسة العين Eye lens ، هذه تقوم بوظيفة عدسة مكبرة عادية تكبر الصورة الحقيقية لتمكن العين من رؤية الصورة النهائية للمرئى .

يمكن حساب التكبير الكلى الناتج من الميكروسكوب المركب بضرب قوة تكبير الشيئية المستعملة فى قوة تكبير العينية المستعملة معها . وقوة تكبير الشيئية محفورة على حاملها المعدنى ، أما قوة تكبير العينية فإنها تكتب عادة فى نهاية غلاف عدسة العين ، أو على جانب العينية . وقوة التكبير النهائية الناتجة من استخدام العدسات الشيئية الثلاث المذكورة سابقا تكون كالتالى :

شيئية ١٦ مم مع عينية × ١٠ تعطى تكبير كلى = ١٠٠
شيئية ٤ مم مع عينية × ١٠ تعطى تكبير كلى = ٤٤٠
شيئية ١,٨مم مع عينية × ١٠ تعطى تكبير كلى = ٩٥٠

يوجد بالميكروسكوب إطاران للضوابط ، يتم بواسطتهما تحريك أنبوبة الميكروسكوب رأسيًا ، حتى يسهل ضبط الأجزاء البصرية للميكروسكوب على المرئى ، وهما الضابط التقريبى Coarse adjustment الذى يحرك أنبوبة الميكروسكوب بسرعة ليجعل المرئى عند بعد بؤرى تقريبى ، والضابط الدقيق Fine adjustment الذى يحرك أنبوبة الميكروسكوب ببطء لضبط المرئى عند البعد البؤرى الصحيح .

القدرة التوضيحية RESOLVING POWER

نظرًا لأن التكبير الكلى للميكروسكوب المركب هو حاصل ضرب قوة تكبير الشيئية × العينية ، فإننا نتوقع إمكانية زيادة التكبير الكلى إلى ما لانهاية باستعمال عدسات إضافية ، ولكن هذا لايحدث بسبب القدرة التوضيحية للعدسة Resolving Power (انظر شكل (١ – ٢) . والقدرة التوضيحية للعدسة هى : عبارة عن قدرتها على توضيح تفاصيل نقطتين شديدتى القرب ، وذلك بشكل واضح ومنفصل وليس كجسم واحد غير واضح المعالم .

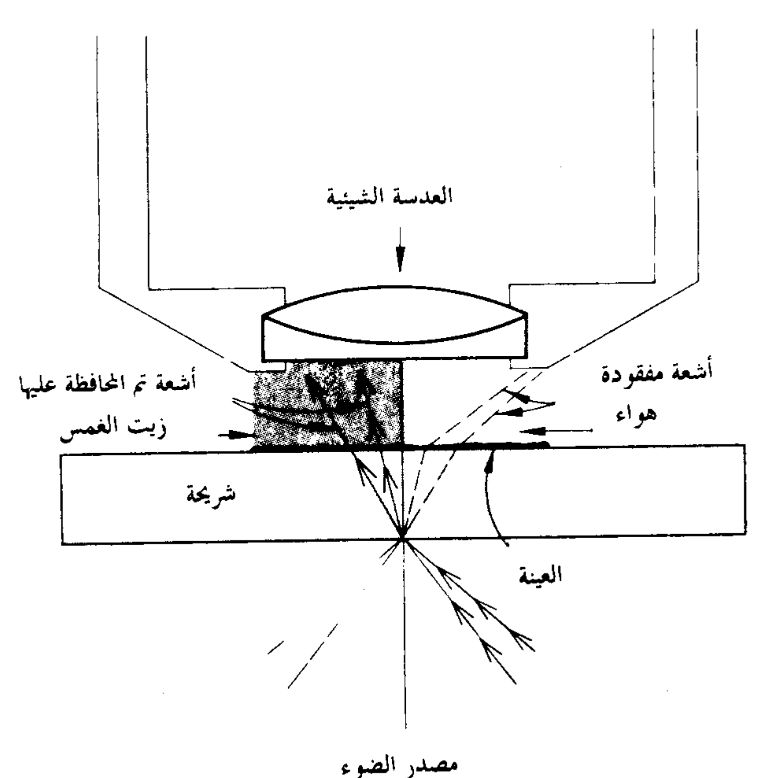
ترتبط هذه الخاصية بطول موجة الضوء المستعمل فى الفحص وقيمة الفتحة الرقمية للعدسة Numerical aperture .

$$\text{القدرة التوضيحية} = \text{قطر أصغر تركيب مرئى} = \frac{\text{طول الموجة}}{\text{الفتحة الرقمية}}$$

وعلى ذلك .. فإنه كلما صغر طول موجة الضوء المستعمل صغر التركيب الممكن رؤيته ، وبعبارة أخرى .. فإن القدرة التوضيحية تزداد بقصر طول الموجة الضوئية ، فمثلا .. نجد أن الضوء الأزرق يعطى قدرة توضيحية أكبر من الضوء الأحمر وتفوقهما جميعا الأشعة فوق البنفسجية ، ونظرًا لأن طيف الضوء المرئى ضيق نسبيا ، فإن زيادة القدرة التوضيحية بتصغير طول موجة الضوء المستعمل يعتبر محدود القيمة .

أما بالنسبة للفتحة الرقمية للعدسة .. فإنه كلما ازدادت قيمتها زادت القدرة التوضيحية ، وعلى ذلك فإنه يمكن الوصول إلى أكبر قدرة توضيحية بالميكروسكوب الضوئى بزيادة الفتحة الرقمية . الفتحة الرقمية للشيئية عبارة عن محصلة العلاقة بين قطر العدسة الشيئية بالنسبة إلى بعدها البؤرى ومعامل الانكسار Refractive index للوسط بين المرئى والشيئية ، وتوجد عوامل بصرية تحدد من زيادة الفتحة الرقمية للعدسة الشيئية عن حدود معينة .

نظرا لأن معامل انكسار الهواء أقل من الزجاج .. فإن الأشعة الضوئية تنكسر عند مرورها من الشريحة الزجاجية إلى الهواء ، وعلى ذلك .. فإن الكثير من الأشعة الضوئية التى تنكسر من العينة المفحوصة على الشريحة لا تصل للعدسة الشيئية ؛ مما يؤدى إلى قلة الضوء الواصل إلى العدسة وبالتالى عدم وضوح الصورة . ولكن بوضع زيت الغمس immersion oil – وهذا له نفس معامل انكسار الزجاج – بين الشريحة ، والشيئية ، فإننا نقلل كثيرا من انكسار الأشعة ، وبذلك فإن نسبة أكبر من الأشعة الضوئية المارة من العينة المفحوصة ، ستصل مباشرة إلى الشيئية ؛ مما يزيد من كمية الضوء النافذ إلى الشيئية فيؤدى إلى زيادة وضوح الصورة (انظر شكل ١ – ٣) .



شكل (١ – ٣) : كيف تزيد العدسة المنغمسة فى الزيت كمية الإضاءة المارة من العينة إلى العدسة الشيئية .

عند تقدير القدرة التوضيحية .. فإن العلاقة ما بين طول موجة الضوء المستعمل والفتحة الرقمية تطبق فقط فى حالة استعمال أشعة ضوئية متوازية Parallel ، ولكن عند إضاءة المرئى بالضوء المائل Oblique light بالإضافة إلى أشعة الضوء المباشر ، فإن تلك العلاقة تصبح :

$$\text{القدرة التوضيحية} = \frac{\text{طول الموجة}}{2 \times \text{الفتحة الرقمية}}$$

وعلى هذا .. فإن عدسة المكثف الموجود أسفل المسرح تزود المرئى بالضوء المائل بالإضافة إلى الضوء المباشر ؛ مما يزيد من القدرة التوضيحية للميكروسكوب الضوئى .

الإضاءة ILLUMINATION

كما أن الظلام ، أو توهج ضوء الشمس المباشر يمكن أن يعمى الرؤية ، فإن الإضاءة الضعيفة يمكن أن تسبب تعتيما لمجال الرؤية بالميكروسكوب . لذلك فإن الإضاءة المناسبة تعتبر ضرورية للانتفاع الأمثل بقوة التكبير والتوضيح بالميكروسكوب .

يعتبر ضوء النهار العادى أيسر مصدر للإضاءة ، ولكن نظرا لأن شدة ضوء النهار تختلف كثيرا ، فإنه عادة ما تستعمل مصادر الضوء الصناعى (غالبا لمبة تنجستين) ، وتمتاز مثل هذه المصادر بأنه يمكن التحكم فى لونها وشدتها ، وحجم الحزم الضوئية الصادرة منها .

وكما يلاحظ فى شكل (١ - ١) .. فإن الضوء الناتج من مصدر الإضاءة يمر خلال المكثف الموجود بأسفل المسرح إلى الشيئية . ويختلف حجم مخروط الضوء المار من خلال الميكروسكوب باختلاف كل عدسة شيئية ، فكلما زادت قوة تكبير الشيئية قلت مسافة التشغيل (شكل ١ - ٢) وزادت الزاوية الرقمية angle of aperture للشيئية ، لذلك فبزيادة قوة التكبير فإن مخروطا أكبر من الضوء يجب أن يمر بالشيئية . ويمكن التحكم فى حجم مخروط الضوء بواسطة الحجاب القزحى Iris diaphragm الموجود مباشرة أعلى المكثف . ويلاحظ أنه عند استعمال الشيئية ذات القوة الصغرى ، أو الكبرى الجافة ذات قوى تكبير ١٠ ، ٤٤ على التوالى .. فإن الحجاب لا يفتح بأكمله ، حيث إنه عند هذه الدرجات من التكبير فإن التفاصيل تكون واضحة عندما تكون الإضاءة قليلة . ولكن عند استعمال العدسة الزيتية التى تكبر ٩٥ مرة ، فإن مسافة التشغيل تكون عند أدناها ويفتح الحجاب لدرجة أكبر .

يختلف نظام الإضاءة فى ميكروسكوب متباين الأطوار الضوئى وفى ميكروسكوب المجال المظلم عما ذكر سابقا ، وسيناقش ذلك خلال تدريبى ٢ ، ٣ .

USE OF THE MICROSCOPE استعمــال الميكـروســكوب

١ – ضع الشريحة ، وعلى سطحها العلوى العينة المطلوب فحصها ، على مسرح الميكروسكوب ، على أن يكون الجزء المطلوب فحصه موجودًا أمام الثقب الواقع فى وسط المسرح .

٢ – اضبط مصدر الإضاءة حتى تمر أكبر كمية من الضوء خلال العينة ، وبعد وضع الشيئية ذات القوة الصغرى فى موضعها ، اخفض انبوبة الميكروسكوب باستعمال الضابط التقريبى حتى تصبح الشيئية على مسافة أقل من مسافة التشغيل ؛ أى على بعد حوالى ٦ مم من الشريحة .

٣ – انظر من خلال العينية ، وببطء ارفع انبوبة الميكروسكوب بالضابط التقريبى حتى تصبح العينة فى البعد البؤرى تقريبا . تجنب دائما أثناء النظر من خلال العينية ، خفض أنبوبة الميكروسكوب إلى أسفل لضبط البعد البؤرى . وبواسطة الضابط الدقيق اضبط الميكروسكوب لتحصل على أحسن صورة للمرئى . عدل الإضاءة برفع المكثف لأعلى مع فتح الحجاب حتى تختفى حافة الحجاب من الرؤية .

٤ – بعد فحص العينة بالشيئية ذات القوة الصغرى ، حرك القطعة الأنفية باحتراس فى اتجاه عقرب الساعة لكى تحل القوة الكبرى الجافة محل القوة الصغرى وتثبت فى وضعها بالضبط ، على أن تتأكد أولا من وجود الجزء المطلوب فحصه من العينة فى وسط مجال الفحص للشيئية ذات القوة الصغرى ، ويعتبر هذا ضروريا لأن قطر دائرة مجال الفحص فى حالة التكبير الأعلى يكون أقل نسبيا عنه فى حالة التكبير الأقل .

تحذير : لا تلمس عدسات الشيئية بأصابعك .

٥ – يجب أن يكون المرئى عند البعد البؤرى تقريبا . انظر من خلال العينية وببطء باستعمال الضابط التقريبى ، اضبط الصورة بشكل تقريبى ، ثم أحصل على أحسن صورة للمرئى باستعمال الضابط الدقيق . تذكر دائما بضرورة عدم ضبط الصورة بخفض أنبوبة الميكروسكوب لأسفل أثناء النظر فى العينية ، وعليك أن تلاحظ باستمرار العدسة الشيئية بالعين من جانب الميكروسكوب عند محاولة تقريبها من الشريحة ، ويكون ضبط الصورة بتحريك الشيئية لأعلى بعيدًا عن الشريحة .

٦ – يحتاج ضبط الصورة بالعدسة الزيتية لعناية أكبر مما يتخذ فى حالة العدسات الشيئية الأخرى ، ولكن الطريقة التى تتبع هى فى الأساس واحدة .

أولا : تستعمل الشيئية ذات القوة الصغرى فى ضبط الجزء المطلوب فحصه ليكون فى

وسط مجال الفحص ، حيث إن قطر دائرة مجال الفحص فى حالة الزيتية أقل كثيرا مما فى حالة الشيئيتين الجافتين . ارفع أنبوبة الميكروسكوب لأعلى ثم ادر القطعة الأنفية حتى تثبت الزيتية فى وضعها تماما ، ثم ضع نقطة من زيت الغمس فوق المرئى أعلى الشريحة فى المكان المتوقع أن تنغمس فيه العدسة ، ومع ملاحظة الشيئية بالعين من جانب الميكروسكوب اخفض بحذر الأنبوبة حتى تنغمس الزيتية فى قطرة الزيت على أن تكون حذرا بحيث لا تلمس الشيئية الشريحة . ستظهر الصورة بسرعة لأن مسافة تشغيل الزيتية صغيرة نسبيا . بمجرد ظهور الصورة استعمل الضابط الدقيق وعدل الإضاءة باستخدام الحجاب لتحصل على أوضح صورة .

إذا وجدت صعوبة فى رؤية الصورة ، حرك ضابط المسرح أثناء ضبط الصورة ؛ إذ إن تلك الحركة ستسهل رؤية الصورة عندما تكون فى البعد البؤرى .

وفى كل مرة عقب الإنتهاء من الفحص بالزيتية ، نظف الزيت الموجود على العدسة بورق تنظيف العدسات ، حتى تعود العدسة إلى حالتها الأولى .

احتياطات خاصة SPECIAL PRECAUTIONS

للمحافظة على نظافة الميكروسكوب وعلى عدساته يراعى الآتى :

١ – لا تلمس العدسات بأصابعك حتى لا تعلوها سحابة تمنع وضوح الرؤية . وإذا اتسخت العدسات امسحها برفق بالورق الخاص بتنظيف العدسات .

٢ – لا تترك الشريحة على الميكروسكوب أبدا بعد الاستعمال .

٣ – امسح دائما الزيت من على العدسة بعد الاستعمال ، وإذا ما وصل الزيت للعدسات الشيئية الأخرى ، امسحه بسرعة بورق تنظيف العدسات . أما إذا جف الزيت على العدسة ، فيزال بورق تنظيف العدسات المبلل قليلا بالزيلول ، مع مراعاة أن كثرة الزيلول قد تسبب إذابة المواد اللاصقة للعدسات المركبة فتسبب تلف العدسة الشيئية .

٤ – يجب أن يحتفظ بمسرح الميكروسكوب نظيفا وجافا على الدوام ، فإذا ما سكب أى سائل ، يجفف المسرح بقطعة خاصة من القماش غير وبرية نظيفة ، وتزال آثار الزيت من على المسرح بقطعة قماش ناعمه نظيفة مبللة بالزيلول ، ثم ينظف المسرح ويجفف .

٥ – أثناء الفحص بالزيتية لا تمل بالميكروسكوب ، حتى لا يسيل الزيت إلى أسفل حيث يصعب إزالته ، أو يتساقط داخل المكثف ، ويتصلب .

٦ – عند عدم استعمال الميكروسكوب ، احتفظ به مغطى وفى داخل صندوقه .

لتجنب كسر الميكروسكوب يراعى الآتى

١ – لا تستخدم القوة فى تشغيل الميكروسكوب ، فكل أجزائه يجب أن تعمل بسهولة ويسر . إذا ما لاحظت أن أى جزء بالميكروسكوب لا يعمل كما يجب ، فلا تحاول أن تعالج ذلك بنفسك بل عليك أن تبلغ على الفور المشرف على المعمل .

٢ – لا تدع العدسة الشيئية تلمس الشريحة أو غطاء الشريحة أبدا .

٣ – لاتحرك أبدا أنبوبة الميكروسكوب لأسفل بالضابط التقريبى أثناء نظرك خلال الميكروسكوب .

٤ – لا تبدل أبدا العدسات الشيئية ، أو العينية بين الميكروسكوبات المختلفة ، ولا تفك تحت أى ظرف من الظروف العدسات الأمامية للشيئية .

٥ – احتفظ بالميكروسكوب فى صندوقه الخاص عند عدم الاستعمال ، وعليك قبل حفظ الميكروسكوب فى صندوقه أن تدير القطعة الأنفية لتكون الشيئية ذات القوة الصغرى فى موضعها ، على أن تتأكد من أن المسرح الميكانيكى المتحرك (المسرح الإضافى) لا يمتد بعد نهاية حافة مسرح الميكروسكوب .

تـدريـــب (١)

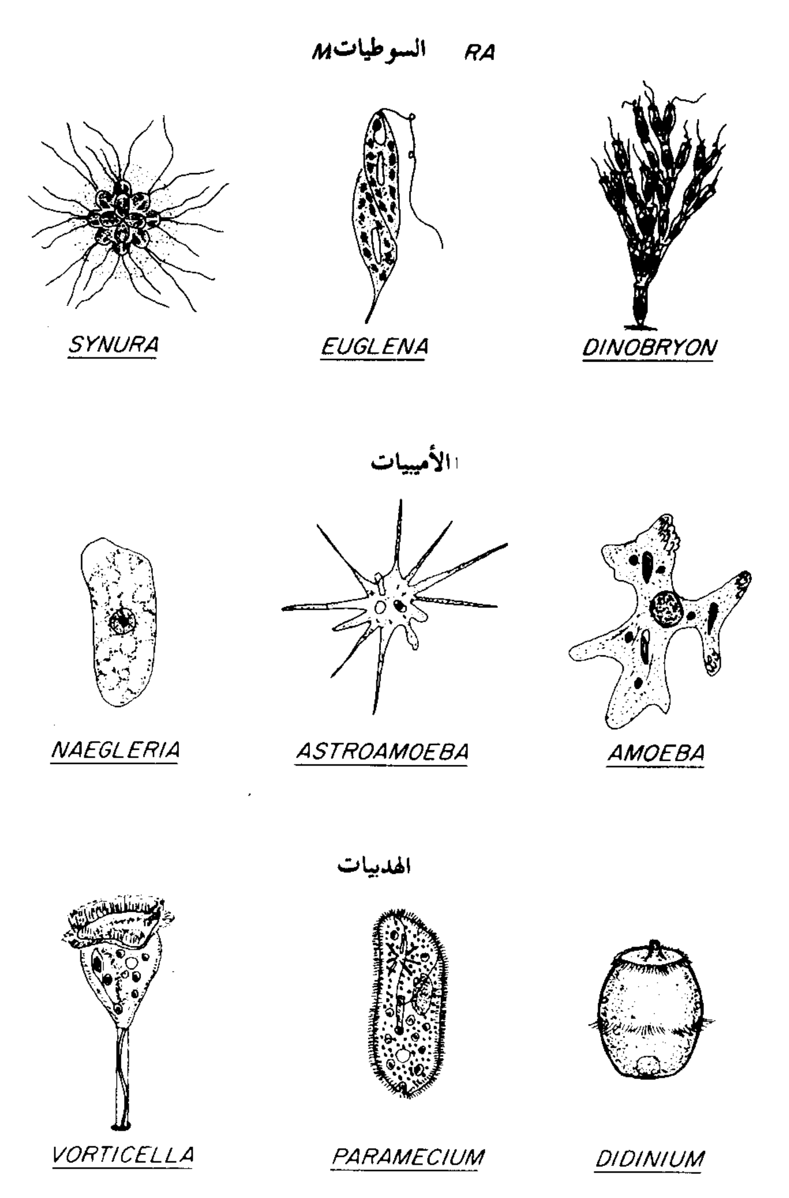
فحص سوائل طبيعية — Examination of Natural Infusions

إذا استطاعت عين الإنسان أن تقوم بعملية التكبير بنفس درجة الميكروسكوب المركب ، لأصبح من الممكن فعلا رؤية الكائنات الدقيقة فى أى مكان . ولإثبات هذا .. دعنا نفحص بعض المواد الطبيعية المعروف بانها تحتوى على أعداد كبيرة من الميكروبات مثل منقوع الدريس وسوائل معدة المجترات ومياه البحيرات الراكدة .

فى هذا التدريب .. سنستعمل العدسات الشيئية ذات القوة الصغرى والكبرى ، لذلك فإن أعداد وأنواع الكائنات الدقيقة التى سنشاهدها سيصبح محددا بمدى تكبير تلك العدسات .

طريقة العمل — PROCEDURE

جهز تحضيرا بالطريقة المبتلة ، wet-mount preparation ، بوضع نقطة من العينة ، بواسطة الإبرة ذات العقدة ، على شريحة ، ثم غط بغطاء الشريحة ، مع مراعاة وضع الغطاء من جانب واحد ليغطى



شكل (١) : بعض أنواع من البروتوزوا .

العينة باحتراس حتى تتخلص من فقاعات الهواء – افحص التحضير بالميكرسكوب مستعملا القوة الصغرى ثم الكبرى .

معظم ما ستشاهده من كائنات دقيقة هو عبارة عن بروتوزوا – هل تستطيع أن تعرف أنواعا ممثلة للثلاث مجاميع الهامة من البروتوزوا : الأميبية Amoebae ، والهدبية Ciliates والسوطية Flagellates ؟

قد تستطيع بالفحص الدقيق مشاهدة أجساما أخرى أصغر متحركة ، وهى عبارة عن أنواع من البكتيريا الكبيرة .

ارسم ما تشاهده .

الكائنات الدقيقة – غير المتحركة ، مثل كل الحبيبات الصغيرة ، يكون لها فى السائل حركة براونية Brownian movement ، هذه الحركة تحدث نتيجة لتلاطمها مع جزيئات السائل المحيط بها ، وهى حركة غير حقيقية تتم بلا هدف بواسطة الخلايا لمسافات قصيرة . ومع ذلك .. فقد تلاحظ أحيانا كائنات دقيقة متحركة لمسافات محسوسة ، تدور حول نفسها فى اتجاهات معينة بحالة مستقلة عن الكائنات الأخرى .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هى التجارب التقليدية فى الميكروبيولوجى التى يشابهها هذا التدريب ؟

٢ – فى هذه التجارب التقليدية ، ما هى السوائل الطبيعية التى اختبرت وما هى الميكروبات التى فحصت ؟

٣ – ما هو المدى الذى تتراوح خلاله أحجام البروتوزوا ؟

٤ – لماذا شكلت البروتوزوا غالبية أنواع الكائنات الدقيقة التى شاهدتها ؟

تدريـب (٢)

فحص البكتيريا الحية Examination of Living Bacteria

كثير من أنواع البكتيريا الحية سريعة الحركة ، ونظرا لأنه من الصعب فحص البكتيريا غير المصبوغة ، لأن الخلايا البكتيرية عديمة اللون ودرجة تباينها عن الوسط الذى تعيش فيه طفيفة ، إلا أنه يمكن رؤية البكتيريا ومشاهدة حركتها باستعمال التحضيرات المبتلة والنقطة المعلقة Hanging-drop preparations كما ستفصل فى الطريقة التالية :

افحص العرض الخاص بالبكتيريا الحية المتحركة وغير المتحركة التى أعدها مشرف المعمل ، ثم جهز تحضيرات من المزارع المقدمة لك ولاحظ الحركة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – جهز تحضيرات بالطريقة المبتلة من مزارع

Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Enterobacter aerogenes.

وذلك بوضع نقطة من كل مزرعة على شريحة بواسطة الإبرة ذات العقدة – بعد التغطية بغطاء الشريحة افحص الحركة بالعدسة الزيتية .

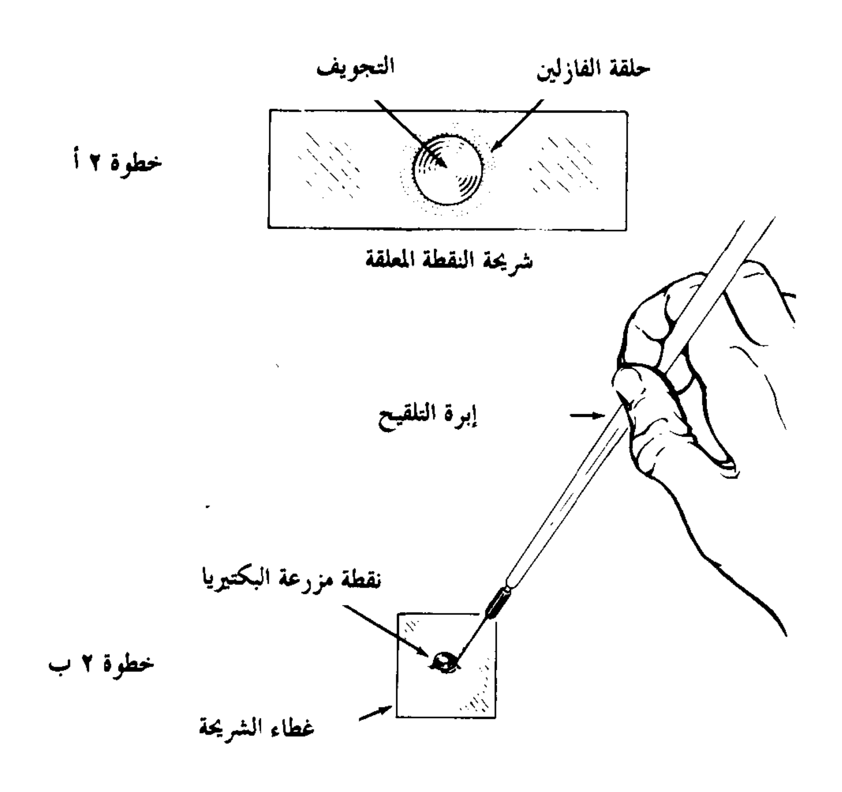
٢ - جهز من نفس المزارع تحضيرات بطريقة النقطة المعلقة :

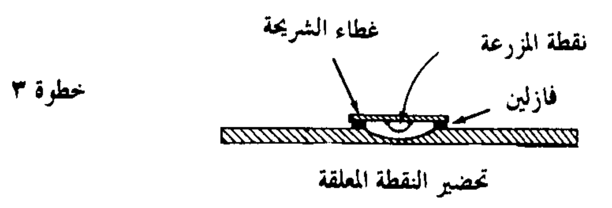
(أ) ضع بواسطة قضيب زجاجى رفيع فازلين حول تجويف شريحة النقطة المعلقة .

(ب) بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة ، انقل مقدار نقطة واحدة من المزرعة ، وضعه فى وسط غطاء الشريحة النظيفة .

(جـ) اقلب الشريحة ذات التجويف على غطاء الشريحة بحيث تقع نقطة المزرعة فى وسط تجويف الشريحة دون أن تلمسها ، وبالضغط الخفيف على جوانب غطاء الشريحة يلتصق الغطاء بالشريحة نتيجة لوجود الفازلين .

٣ - بسرعة وعناية اقلب الشريحة ليكون الغطاء إلى أعلى والنقطة معلقة فى وسط التجويف . لاتدع النقطة تسقط أو تلمس قاع التجويف .





شكل (١) : تحضير النقطة المعلقة .

٤ – لفحص النقطة المعلقة .. عدل أولاً موضع النقطة بحيث ترى حافتها فى وسط مجال النظر – كخط لامع متموج على خلفية رمادية – وذلك بتحريك الشريحة ، واستعمال القوة الصغرى ، وتقليل الضوء الداخل إلى الميكروسكوب بواسطة الحجاب .

انقل إلى القوة الكبرى ثم إلى الزيتية بتحريك القطعة الأنفية .

استعمل الضابط الدقيق حتى ترى حافة النقطة المعلقة بوضوح حيث تستطيع مشاهدة البكتيريا بحركتها وتباينها عن الوسط المحيط بها . كما يراعى الاحتراس فى التمييز بين الحركة الحقيقية والحركة البراونية . افحص العرض المجهز للحركة بواسطة الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى .

أسـئلة QUESTIONS

١ – لماذا تضبط الرؤية أولا على حافة النقطة المعلقة ولا تضبطها مباشرة على البكتيريا المعلقة بالنقطة ؟

٢ – لا تعود الحركة فى كل أنواع الكائنات الدقيقة المتحركة إلى الفلاجلات ، ما هى أنواع الحركة الأخرى التى تستطيع وصفها ؟

الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى وميكروسكوب المجال المظلم PHASE MICROSCOPY AND DARK - FIELD MICROSCOPY

لاحظنا فى تدريب (٢) أنه كان من الصعب نسبيًّا ملاحظة الخلايا البكتيرية الحية بالميكروسكوب ، وذلك بسبب الفروق الضئيلة فى درجة التباين بينها وبين الوسط المائى المحيط . وفى التمرين التالى وما سيليه سنلاحظ كيف يؤدى الصبغ إلى وجود تباين بين الخلايا وما يحيط بها من وسط باستخدام الميكروسكوب الضوئى التقليدى ، ومع ذلك فإن الميكروسكوب الضوئى المعدل يمكن أن يخلق هذا التباين لفحص الخلايا الحية بدون صبغ . وأكثر الأنواع شيوعا لتحقيق هذا الغرض هما نوعين من الميكروسكوب : الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى وميكروسكوب المجال المظلم .

الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى Phase Microscope

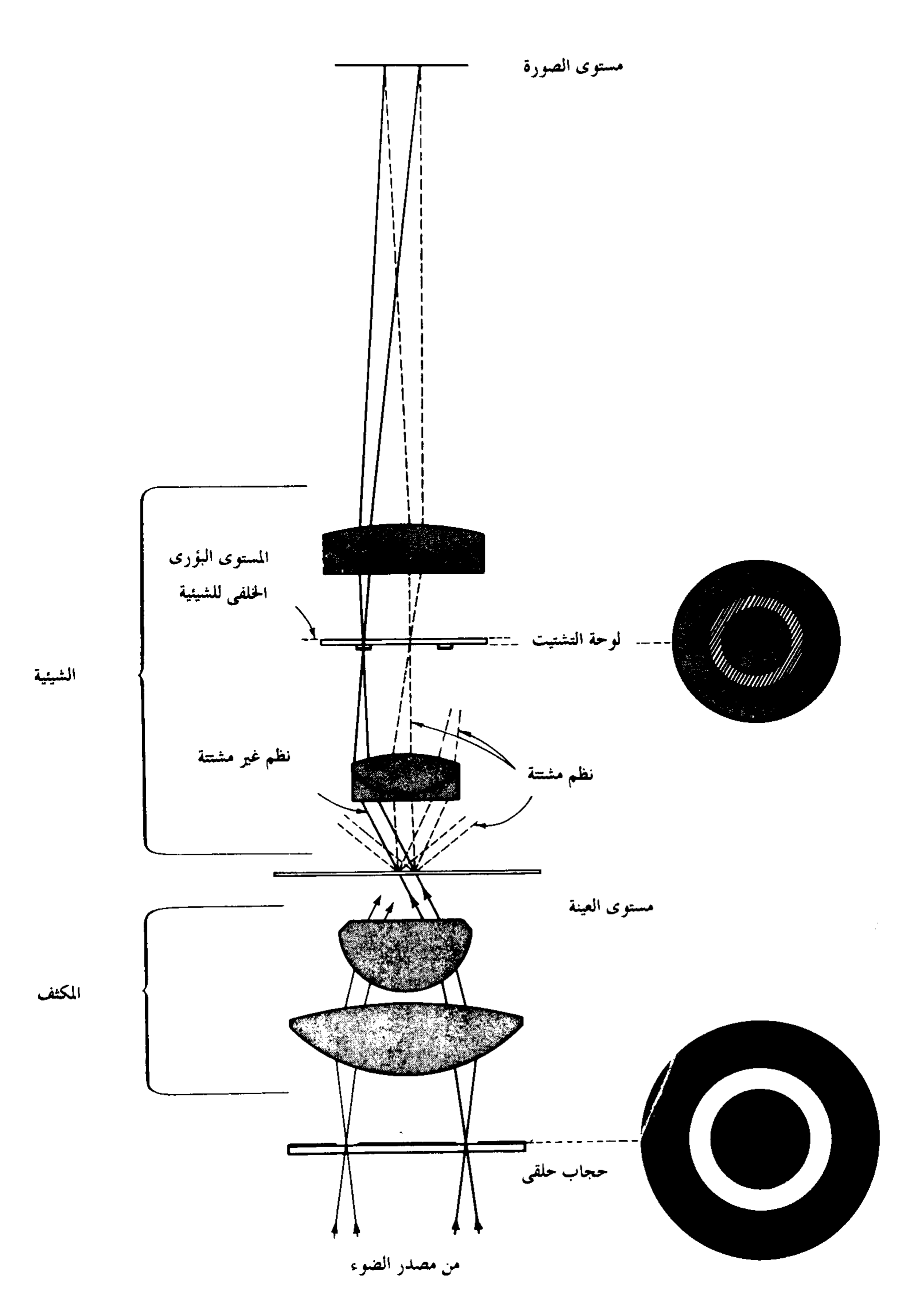
على الرغم من التشابه الكبير بين الصفات البصرية لمعظم الخلايا البكتيرية والوسط المائى المحيط ، فإن فروقا طفيفة فى قدرة امتصاص الضوء light absorbance وفى المرور البصرى optical path ، بين الخلية البكتيرية ومحتوياتها والوسط المحيط ، يمكن أن تؤدى إلى تأخير موجات الضوء ، أو تغير من

اتجاهها ، مسببة تباينًا فى أطوار الموجات الضوئية المارة ، ورغم وجود هذه الفروق بين الموجات المتأخرة وبين باقى الأشعة الضوئية ، إلا أن تلك الاختلافات ليست بدرجة كبيرة حتى يمكن ملاحظتها بالميكروسكوب الضوئى العادى . ويعمل الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى على تقوية هذه الاختلافات وتحويلها إلى اختلافات فى شدة الاضاءة مما يزيد التباين بين مكونات الخلية ومحتوياتها والوسط المحيط ، فيسهل بذلك دراسة الخلايا بحالتها الحية .

يختلف الميكروسكوب المتباين الأطوار عن الميكروسكوب الضوئى العادى فى أن له عند المستوى البؤرى السفلى للمكثف حجابًا حلقيًا Annular diaphragm وله أيضا لوحة تشتيت Diffraction plate فى المستوى البؤرى الحلقى للشيئية . وكما يشاهد فى شكل (١ - ٤) .. فإن الحجاب الحلقى يسمح - فقط - بمرور حلقة من الضوء إلى أعلى خلال المكثف والعينة المفحوصة . وعند مرور الأشعة الضوئية من خلال العينة فإن بعضها يبطؤ وبعضها ينحرف ، أو تمر فى الوسط المحيط بالعينة ، ثم تمر كل من موجات الأشعة المنحرفة وغير المنحرفة كمخروط ضوئى أجوف Hollow cone of light خلال الشيئية ولوحة التشتيت . هذه اللوحة عبارة عن قرص من الزجاج البصرى مغلف ، أو مطلى بطبقة معدنية رقيقة لتمتص الضوء ، وطبقة من مادة ثنائية الكهربية dielectric لتؤخر الضوء ، وبذلك يحدث التباين الضوئى المطلوب . ويوجد للميكروسكوب نظامان من التباين : التباين الفاتح Bright contrast ، وفى هذا النظام تظهر العينة كصورة فاتحة على خلفية داكنة ، والتباين الداكن Dark contrast حيث تظهر الصورة داكنة عن الوسط المحيط بها . إن نوع وتركيب لوحة التشتيت من حيث المواد التى تمتص ، والتى تؤخر الضوء هو الذى يحدد نوع ودرجة التباين .

فى حالة ميكروسكوب التباين الفاتح ، فإن المادة المغلفة للوحة التشتيت التى تمتص وتؤخر الضوء تكون من مادة شفافة فى شكل حلقة ، كما يجب أن تساوى تلك الحلقة - فى الحجم تماما - صورة الحجاب الحلقى المتكون فى الشيئية . وفى هذا النظام من التباين .. تمر الأشعة الضوئية غير المنحرفة من العينة ، أو مما حولها من مادة لوحة التشتيت التى تؤخر وتمتص الضوء ، بينما تمر الأشعة المنحرفة دون إعاقة خلال المساحات غير المطلية من لوحة التشتيت . وعندما تتأخر الموجات غير المنحرفة من العينة بتأثير لوحة التشتيت ، فإنها تصل إلى المستوى البؤرى للعدسة العينية (مركز تكوين الصورة) فى حالة موجية واحدة مثل الأشعة المنحرفة من العينة ؛ أى أن كل منهما داخل موجة الآخر in phase ؛ مما يسبب تقوية الصورة وبالتالى زيادة استضائتها ، وعلى العكس من ذلك فإن أشعة الضوء بالوسط المحيط بالعينة تمتص وتتأخر مسببة خلفية داكنة .

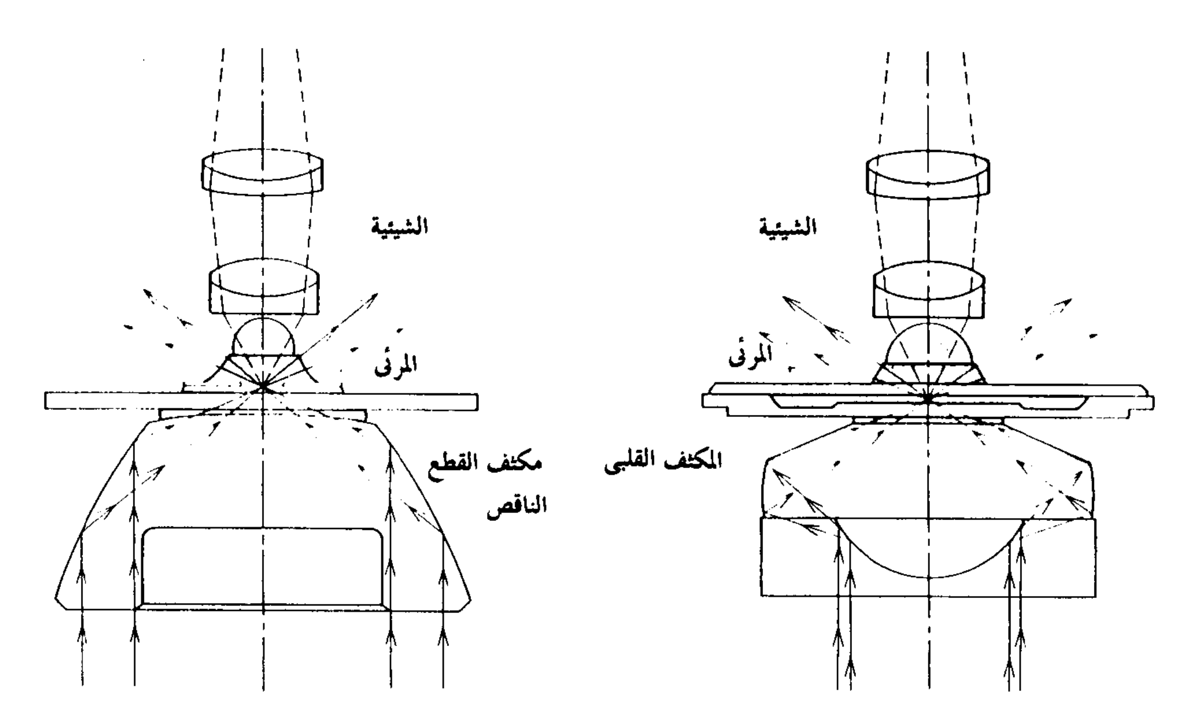
فى حالة ميكروسكوب التباين الداكن ، فإن المادة التى تؤخر وتمتص الأشعة الضوئية توجد على سطح لوحة التشتيت ولا توجد على المنطقة الخلفية التى يمر فيها الضوء المركزى ، لذلك نجد أن الأشعة المنحرفة من العينة هى التى تتأخر ، وبذلك نجد أن كلًا من الضوء المنحرف والضوء غير المنحرف يكونان خارج موج الآخر out of phase عند وصولهما إلى المستوى البؤرى للعدسة العينية (مركز تكوين الصورة) ، فيحدث تعارض موجى؛ ولذا تظهر الصورة داكنة عن الوسط المحيط بها .



شكل (١ – ٤) : تكون الصورة بالتباين الضوئى (إهداء من شركة بوش ولومب) .

الإضاءة فى ميكروسكوب المجال المظلم

تحتاج إضاءة ميكروسكوب المجال المظلم إلى مكثفات خاصة تعطى - كما فى حالة الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى - إضاءة حلقية مكونة ما يسمى بالمخروط الضوئى الأجوف Hollow cone of light . عندما يضبط ذلك المخروط الضوئى على المرئى ، فإن الأشعة الضوئية تتفرق بزاويا متسعة لدرجة أنها لا تدخل بشكل مباشر إلى العدسة الشيئية (انظر شكل ١ - ٥) ، وعندما تصطدم قمة مخروط الضوء بالمرئى ، فإن الأشعة الضوئية تنعكس منه وتمر إلى العدسة الشيئية للميكروسكوب ، ولذلك فإن الفاحص يرى الصورة شديدة الإضاءة لامعة ، بينما يبقى المجال مظلما ، ولذلك سميت هذه الطريقة بطريقة الفحص بميكروسكوب المجال المظلم .



شكل (١ - ٥) : نوعان من مكثفات ميكروسكوب المجال المظلم (إهداء من شركة بوش ولومب) .

وبتوفير التباين المطلوب ، فإن كلا من ميكروسكوب المجال المظلم والميكروسكوب المتباين الأطوار ، يصلحان لدراسة الخلايا الحية . بالإضافة إلى ذلك فإنه يمكن بواسطة ميكروسكوب المجال المظلم فحص أجسام أحجامها أقل من مستوى القدرة التوضيحية للميكروسكوب الضوئى ، وذلك لأن الضوء المنبعث من المرئى فى ميكروسكوب المجال المظلم يمكن مشاهدته حتى ولو كان المرئى نفسه غير ممكن إدراكه .

يستعمل ميكروسكوب المجال المظلم أساسا فى النواحى الطبية ، حيث يستعمل عادة فى تشخيص مرض الزهرى syphilis ؛ إذ إن المسبب لهذا المرض وهو ميكروب *Treponema pallidum* من الصعب

رؤيته وفحصه بالميكروسكوب العادى ، ولكن من السهل رؤيته بالفحص من خلال ميكروسكوب المجال المظلم .

الميكروسكوب الإليكترونى THE ELECTRON MICROSCOPE

نظرا لأن القدرة التوضيحية للميكروسكوب تعتمد على طول موجة الأشعة المستعملة ، لذلك نجد أن أقصى قدرة توضيحية للميكروسكوب الضوئى محددة بأقصر طول موجى من الأشعة المرئية . ويتجاوز الميكروسكوب الإليكترونى هذه العقبة لاعتماده فى الفحص على استخدام شعاع من الإليكترونات بدلا من الضوء المرئى . ونظرا لأن الطول الموجى للشعاع الإليكترونى يمثل جزءا صغيرا من الطول الموجى للضوء المرئى ؛ فإن القدرة التوضيحية للميكروسكوب الإليكترونى أكبر بحوالى ١٠٠٠ مرة عما فى حالة الميكروسكوب الضوئى .

فى الميكروسكوب الإليكترونى .. يمر الإشعاع الإليكترونى من خلال سلسلة من المجالات المغناطيسية ، التى توجه الإليكترونات بطريقة تماثل عمل نظام العدسات فى الميكروسكوب الضوئى ، وبذلك فإن الإليكترونات التى تنفذ ، أو تنعكس من الشئ المفحوص توجه لتكوين صورة مكبرة ، يمكن تصويرها على لوحات حساسة ، أو مشاهدتها على شاشة عرض مفسفرة Phosphorescent screen تسمح برؤية الصورة لامعة .

يوجد نوعان رئيسيان من الميكروسكوب الإليكترونى : الميكروسكوب الإليكترونى النافذ – Transmission electron microscope والميكروسكوب الإليكترونى الماسح Scanning electron microscope .

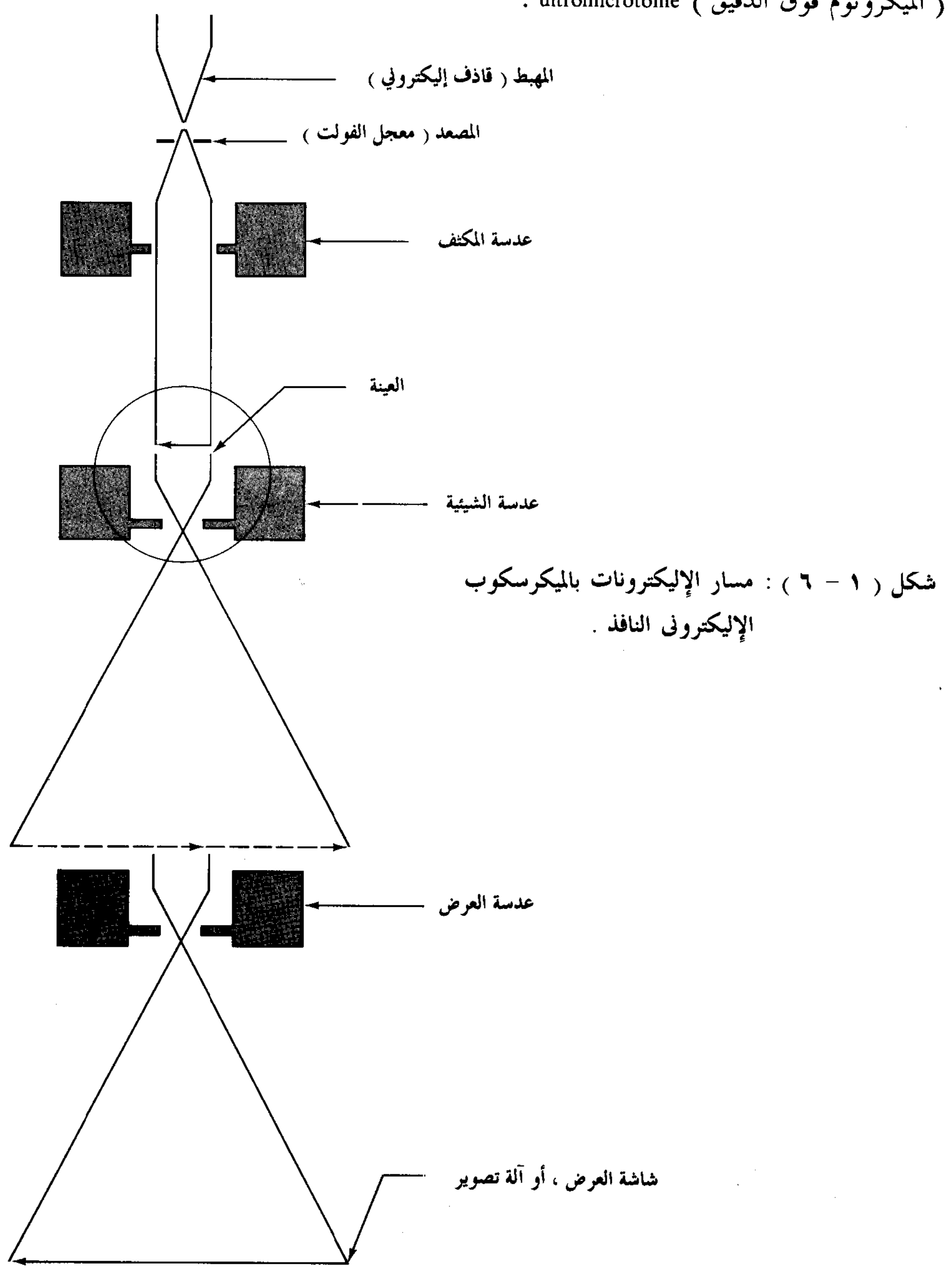
فى حالة الميكروسكوب النافذ .. تتعرض العينة كلية للإشعاع الإليكترونى الذى ينفذ ، أو يمر من العينة ليكون الصورة على شاشة العرض ، ويأتى التباين فى الصورة من الاختلافات فى الكثافة الالكترونية للعينة ، أو من كمية الإليكترونات التى تستطيع المرور من العينة .

أما فى الميكروسكوب الماسح .. فإن كمية قليلة من الإشعاع الإليكترونى هى التى تمسح scanning العينة .

تتجمع الإليكترونات المنبعثة من العينة لتكون صورة على أنبوبة أشعة المهبط Cathode-ray tube .

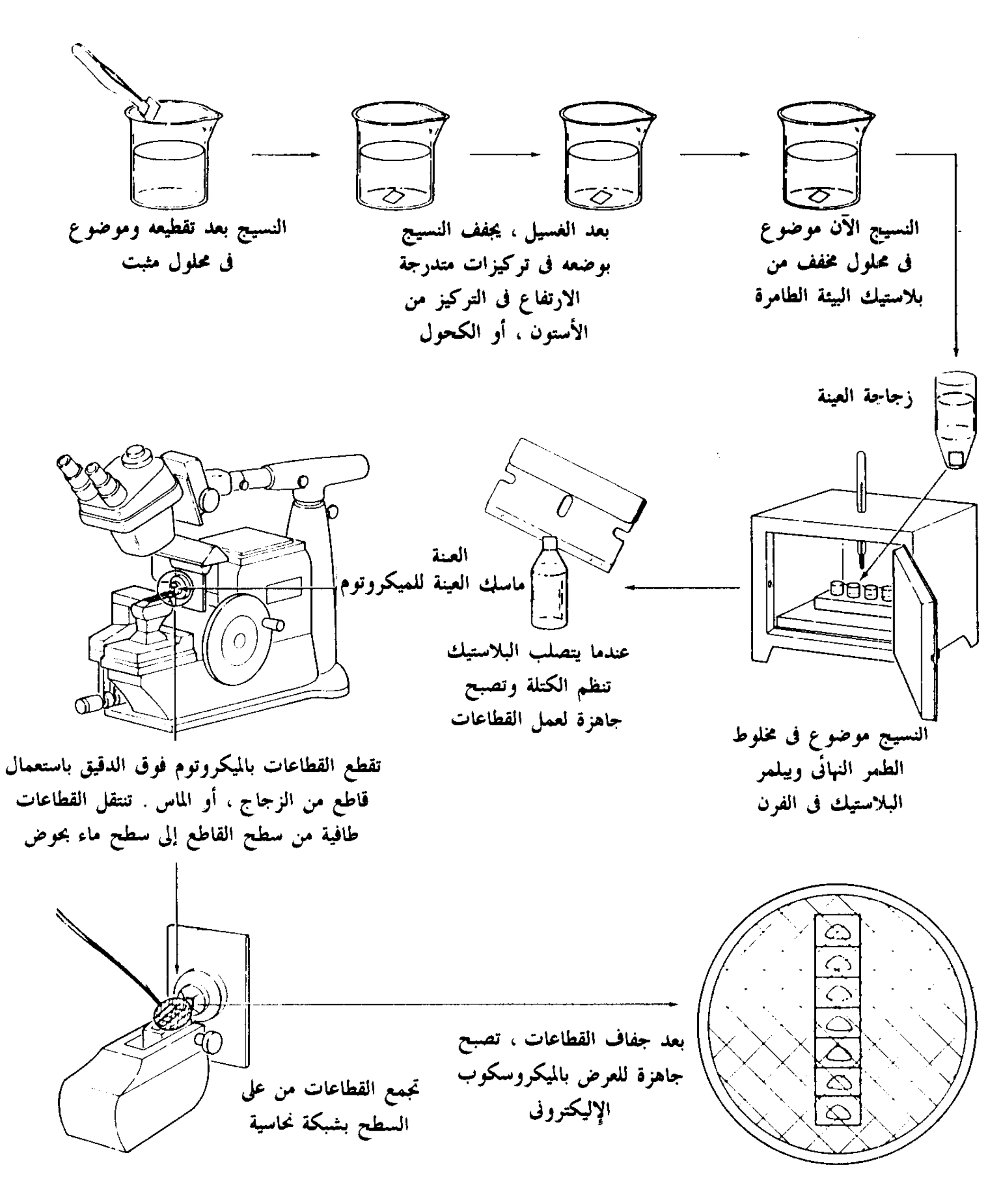
على الرغم من القدرة التوضيحية الكبيرة الممكن الحصول عليها بواسطة الميكروسكوب الإليكترونى ، إلا أن بعض الصعوبات تعترض استعماله . ففى الميكروسكوب النافذ .. نجد أن تحضير العينة وإعدادها للفحص عملية معقدة وتحتاج إلى وقت طويل . فنظرا لأن استخدام شعاع الإليكترونات يحتاج إلى توفير تفريغ كبير فى الحيز الداخلى لأنبوبة الميكروسكوب للمحافظة عليها ، لذلك فإن طرقا خاصة يجب أن تتبع لتجهيز العينة . فكثير من العينات تثبت وتجفف قبل الفحص ، ومثل هذه المعاملات قد تؤدى إلى تغير كبير فى شكل العينة كانكماش فى أجزائها ، أو حدوث التواء وانثناء فيها . كما أن العينة المطلوب فحصها يجب أن تكون ذات سمك مناسب بالدرجة التى بها

تستطيع الإليكترونات أن تمر خلالها . كل هذه الاحتياجات تؤدى إلى أن ما يمكن فحصه هى الأجسام الدقيقة كالبكتيريا والفيروسات . كما أنه لفحص التركيبات الداخلية للخلايا الميكروبية ، فإنه من الضرورى عمل قطاعات رقيقة جدا ultrathin sections باستخدام جهاز الالتراميكروتوم (الميكروتوم فوق الدقيق) ultromicrotome .



شكل (١ - ٦) : مسار الإليكترونات بالميكرسكوب الإليكترونى النافذ .

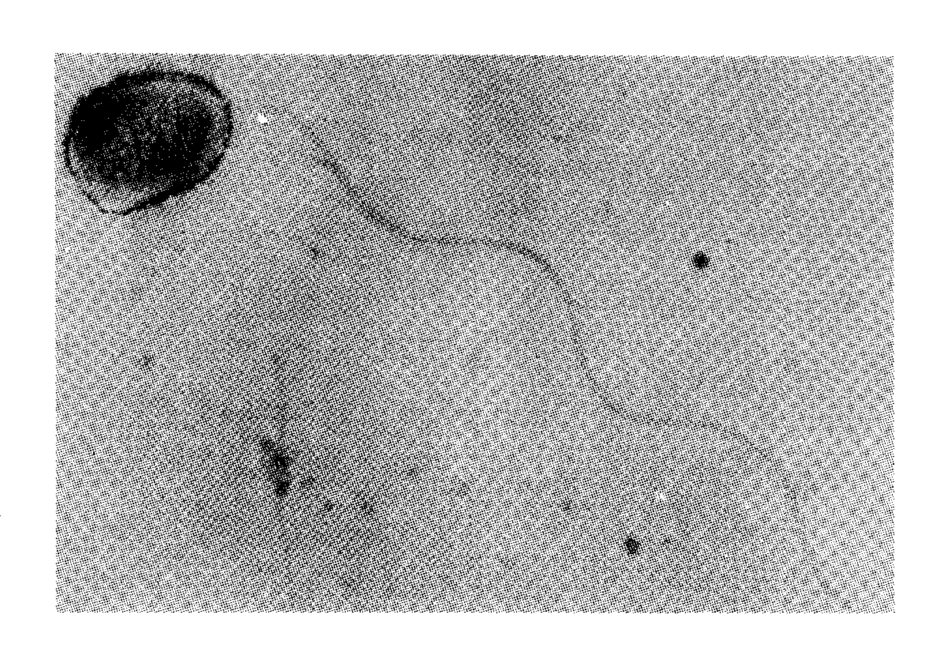
دعنا نستعرض طرق إعداد عينة للعرض بالميكروسكوب النافذ . قبل عمل القطاعات فإنه تجرى للعينة عملية تثبيت Fixation للمحافظة على تركيبها ، وتجفيف Dehydration لإزالة المثبتات الزائدة ، وطمر Embedding فى البلاستيك لمنع تشوه العينة عند عمل القطاعات ، ثم تعمل القطاعات للعينة المطمورة فى البلاستيك بواسطة قاطع خاص من الزجاج ، أو الماس لإنتاج قطاعات رقيقة جدًّا ذات سمك تقريبى يتراوح ما بين ٣٠ - ٦٠ نانومتر (انظر شكل (١ - ٧) .



شكل (١ - ٧) : تجهيز الأنسجة لعمل القطاعات .

عند الفحص بالميكروسكوب الإليكترونى ، قد يكون التباين ضئيلا فى قطاعات العينة الدقيقة بسبب ضآلة كتلتها ، ويتم التغلب على هذه العقبة باستعمال طرق صبغ خاصة لزيادة التباين . ويستعمل لذلك نوعان من الصبغ : الصبغ الموجب ، والصبغ السالب ، وهما يماثلان عملية الصبغ فى الميكروسكوب الضوئى .

فى حالة الصبغ الموجب Positive staining ، تدخل الصبغة العينة وتتحد مع بعض مكوناتها ، وتعتبر سترات الرصاص Lead citrate وخلات اليورانيل Uranyl acetate أكثر الصبغات استعمالا فى حالة الصبغ الموجب . وعادة ما يستعمل صبغ مزدوج أولا بخلات اليورانيل ثم بسترات الرصاص ، وذلك بسبب خواص الصبغ المختلفة لكل من اليورانيل والرصاص . فى حالة الصبغ السالب Negative staining ، والذى عادة ما يستعمل لعينات خاصة .. فإن الصبغ لاينفذ إلى داخل العينة ، ولكنه يحيط بها ويملأ الشقوق التى على سطحها (انظر شكل ١ – ٨) . وفى هذا النوع من الصبغ ، فإنه تستعمل أملاح معادن ثقيلة مثل موليبدات الأمونيوم Ammonium molybdate والفوسفوتنجستات Phosphotungstate .

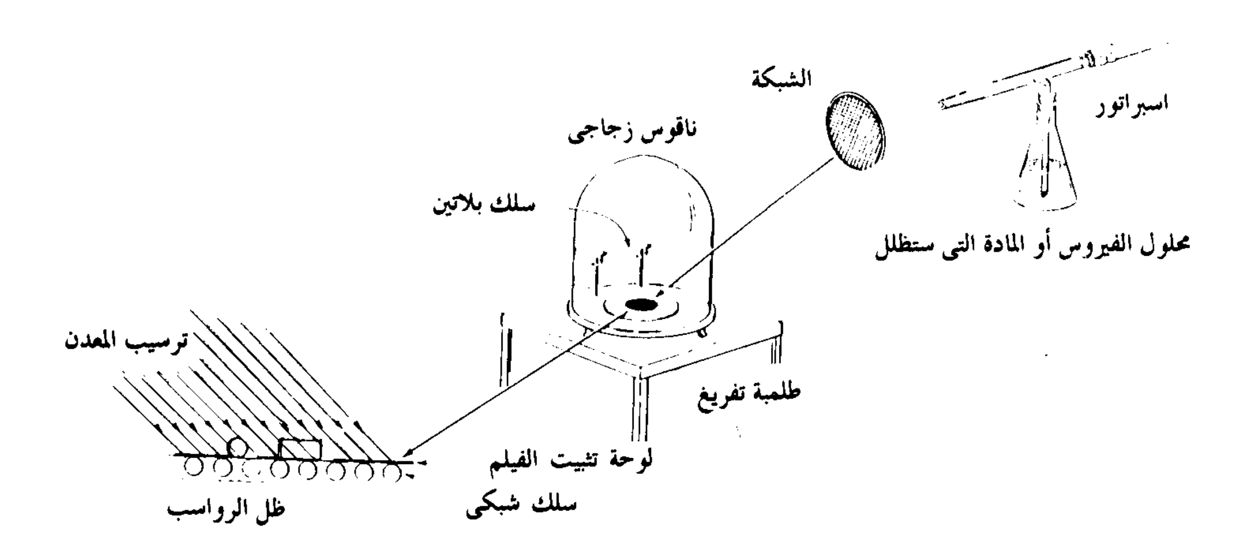


شكل (١ – ٨) : الصبغ السالب لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* وهو يبين تركيب السطح والزوائد (× ٢٧,٠٠٠) (إهداء من د . باميلا فينك) .

هذه الطرق تمكننا من الحصول على معلومات كافية تتعلق بالشكل العام ، والحجم ، وزوائد السطح surface appendages والتركيبات الدقيقة ultrastructure للخلية الميكروبية ، ولكنها تعطى

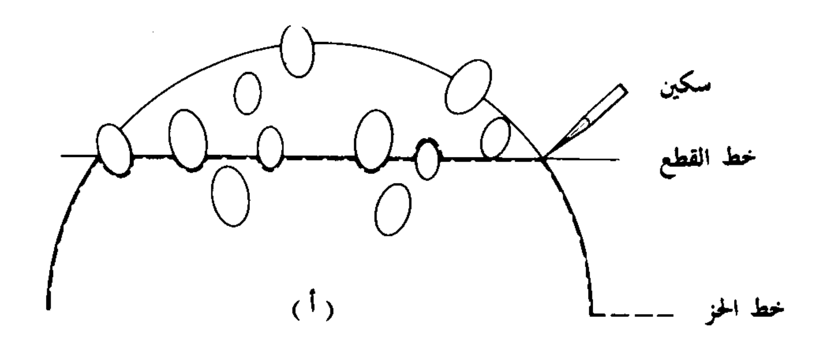
معلومات قليلة عن التركيب المجسم Three-dimensional structure للخلية – ولتغطية هذه المعلومات ، فإنه تستخدم طريقتان : التظليل بالمعدن Metal shadowing ، والتحزيز بالتجميد Freeze- etching .

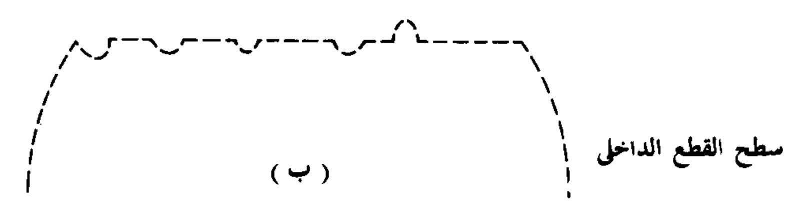
والتظليل بالمعدن الشديد الشبه بالصبغ السالب ، فالجزيئات المطلوب فحصها تطمر embedded فى فيلم رقيق من أبخرة معدن كثيف الإليكترونات مثل البلاتين ، أو الذهب . تغلف ذرات المعدن معالم سطح العينة وفى نفس الوقت تترك مناطق منفذة للإليكترونات ، electron transparent أو ظلال shadows بالمستوى السفلى للغشاء (انظر شكل ١ – ٩) . وعند الطبع .. فإن التأثير الكلى لعملية التظليل بالمعدن من إضاءة وظلال ، يترجم بواسطة العين بشكل طوبوغراف ، فتظهر معالم سطح العينة بوضوح .



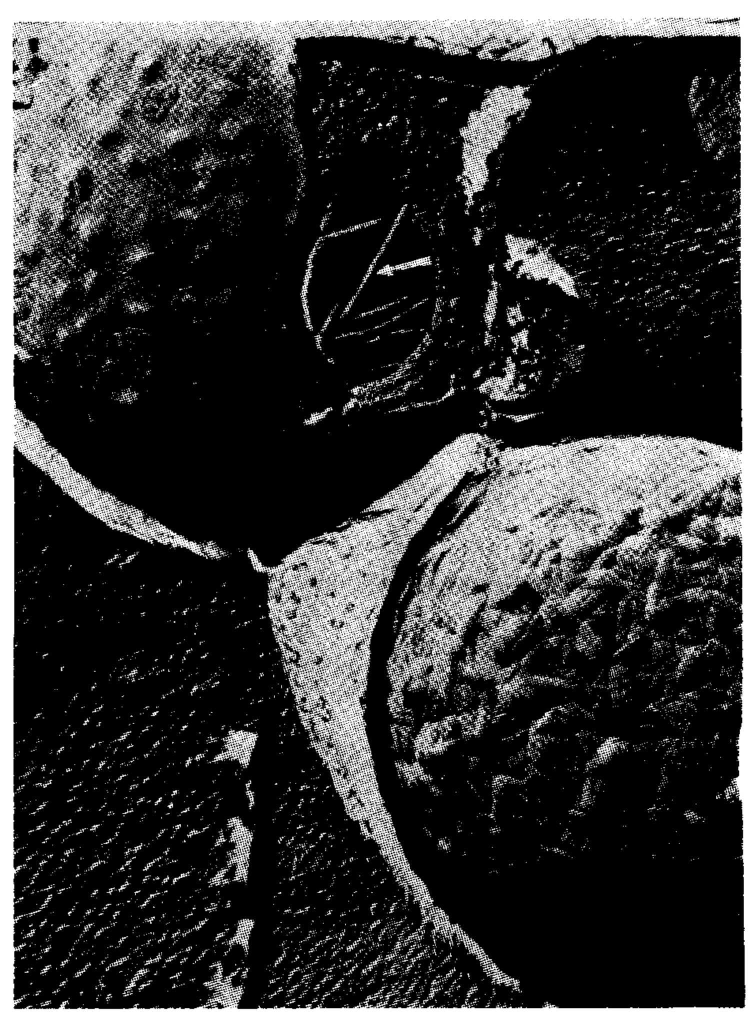
شكل (١ – ٩) : التظليل بالمعدن .

تسمح عملية التحزيز بالتجميد بمشاهدة التركيبات الخلوية الداخلية كما كانت عليه فى الحالة الحية . لتجنب التشوهات التى تحدث عند تحضير العينة نتيجة عملية التثبيت الكيميائى ، فإنه تعمل طبعات Replicas من السطوح باستخدام الكربون ، أو السليكا . هذه الطبعات تكون رقيقة جدًّا ويقوى التباين فيها بالتظليل المعدنى . وفى عملية التحزيز بالتجميد ، فإن معلق الخلايا بالماء يبرد ويجمد بأسرع ما يمكن ، ثم توضع العينة وحاملها فى غرفة مفرغة وتحفظ على درجة حرارة منخفضة . عقب ذلك تقطع العينة بسكين بارد ويعرض السطح المستوى لتفريغ كبير (انظر شكل ١ – ١٠) ، فيتسامى الثلج تاركا التركيبات الدقيقة للخلية بحالتها in relief ، ثم تعمل الطبعات وتظلل سطح العينة بأبخرة المعدن ويغلف بطبقة من الكربون . تستبعد العينة الأصلية ويحتفظ بالمكرر . أفادت هذه الطريقة كثيرا فى فحص تركيبات الأغشية وسطوحها الخارجية والداخلية (انظر شكل ١ – ١١) .



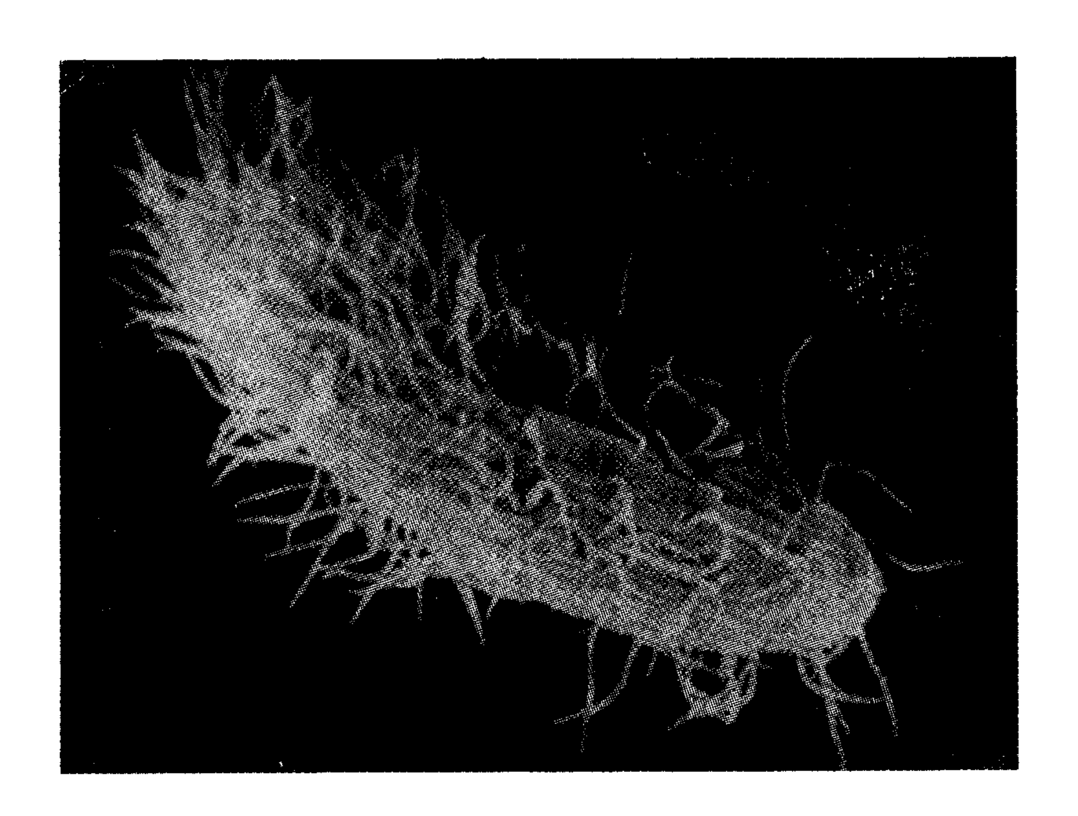


شكل (١ - ١٠) : التحزيز بالتجميد ، التركيب الداخلى المكشوف بالسكين القاطع .
(أ) عند بداية القطع وهو يوضح خط القطع .
(ب) سطح الخلية بعد القطع .



شكل (١ - ١١) : التركيب الفوق لكونيديات *Aspergillus fumigatus* المحضرة بواسطة التحزيز (× ٤٠,٠٠٠) . (اهداء من دكتور و . س . جيورسا) .

رغم أن الميكروسكوب الماسح لا يوفر درجة القدرة التوضيحية الناتجة فى حالة الميكروسكوب النافذ ، إلا أنه يوفر الكثير من المزايا الأخرى . فالعينات تحتاج إلى تجهيزات قليلة وبذلك تقل درجة تشوهها ، بالإضافة إلى أنه يوفر درجة عالية من التباين تجعله عظيم الفائدة بصفة خاصة فى فحص الخواص المورفولوجية ومميزات السطوح للخلايا الميكروبية (انظر شكل ١ - ١٢) .



شكل (١ - ١٢) : صورة بالميكروسكوب الإليكترونى الماسح لبروتوزوا *Tetrahymena pyriformis* **(× ٦٨٠٠) . (إهداء من د . باميلا فينك) .**

تـدريـــب (٣)

فحص الخلايا المصبوغة Examination of Stained Cells

لاحظنا من تدريب ١ ، أن الكثير من المواد الشائعة ، كانت تحتوى على أشكال متعددة من الميكروبات ، لكن أنواع وأعداد هذه الكائنات التى أمكن مشاهدتها ، كانت محددة بقوة تكبير العدسة الشيئية المستعملة . وباستعمال العدسة الزيتية .. أمكننا مشاهدة محتوى كبيرا من الكائنات الأصغر حجما .

بسبب أحجام البكتيريا المتناهية فى الصغر ، فإنها عادة لاتفحص بالعدسات الشيئية ذات القوة الصغرى ، أو الكبرى الجافة ، وكبديل لذلك فإنها تصبغ وتفحص بالعدسة الزيتية .

والتمرين التالى سيكسبك الخبرة فى استعمال العدسة الزيتية ، بالإضافة إلى أنه سيمكنك من عمل دراسة مقارنة بين الأشكال المورفولوجية للخلايا المصبوغة ، ليس فقط للخلايا البكتيرية فحسب ، بل ولأنواع الميكروبات الأخرى المماثلة أيضا .

طريقة العمل PROCEDURE

قبل أن تبدأ فى هذا التدريب ، راجع ملاحظات استعمال العدسة الزيتية (صفحة ٣١ ، ٣٢) . بعد ذلك افحص بالعدسة الزيتية شرائح مصبوغة للخلايا التالية :

1. *Euglena gracilis*
2. *Paramecium aurelia*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Bacillus anthracis*

أسـئلة QUESTIONS

١ - كيف يظهر الغشاء المصبوغ تحت العدسة الزيتية بدون وضع الزيت بين الشريحة ، والعدسة الشيئية ؟ ولماذا ؟

إذا كنت لا تعرف .. قم بتحضير غشاء وافحصه بهذه الطريقة .

٢ - ما هى الاختلافات التركيبية التى لاحظتها بين أنواع الخليا المختلفة التى فحصتها فى هذا التدريب ؟ هل أمكنك ملاحظة وجود ، أو غياب تركيبات بخلايا البكتيريا تشابه تلك الموجودة أو الغائبة بالخلايا الأخرى التى فحصتها ؟ لماذا ؟

تـدريـــب (٤)

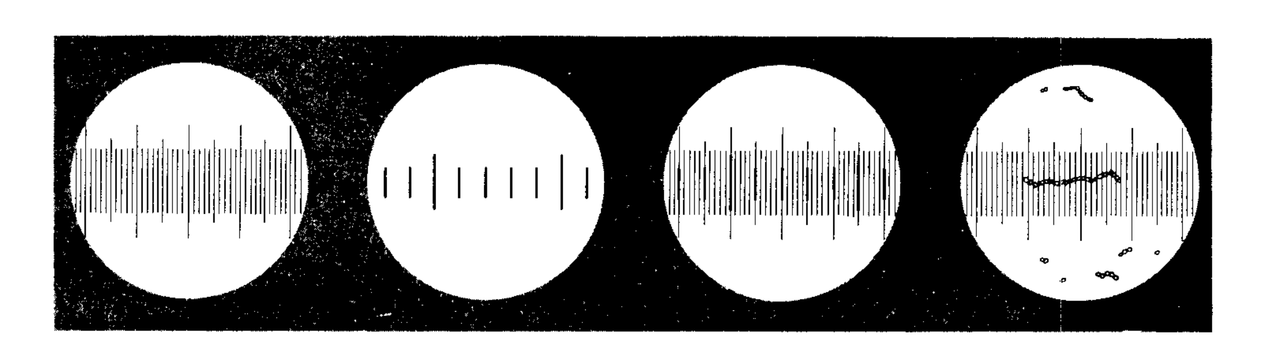
قياسات ميكروسكوبية Microscopic Measurements

لقياس شيء ما بالميكروسكوب .. فإنه يستخدم ميكرومتر (مقياس) العينية Ocular micrometer ليعمل كتدريج ، أو مسطرة . وميكرومتر العينية هذا ببساطة عبارة عن : قرص من الزجاج ، محفور عليه أقسام متساوية . عندما يوضع فى العدسة العينية ، فإن تدريجاته تحدد مسافة معينة بمجال الفحص الميكروسكوبى . ولتحديد القيمة الحقيقية لهذه المسافة تستخدم شريحة ميكرومترية Stage micrometer فى المستوى البؤرى لمجال الميكروسكوب . هذه الشريحة محفور عليها تدريج ، ذو خطوط

متوازية ، والمسافة بين كل خطين تساوى بالضبط ٠١, مم . يطابق تدريج ميكرومتر العينية على تدريج الشريحة الميكرومترية ، وبتقدير عدد أقسام ميكرومتر العينية – التى تطابق مسافة معلومة من تدريجات الشريحة الميكرومترية – يمكن حساب طول كل قسم من أقسام ميكرومتر العينية ، وبالتالى يمكن حساب المسافة الحقيقية التى يقيسها ميكرومتر العينية بمجال الفحص الميكروسكوبى .

وبعد عمل هذا التقيم .. فإنه يمكن استخدام ميكرومتر العينية لقياس حجم الخلايا المفحوصة . ونظرا لأن كل عدسة شيئية بالميكروسكوب تعطى صورة مختلفة التكبير عن الأخرى ، فإن هذا التقيم يجب أن يجرى عند تغيير الشيئية من الصغرى إلى الكبرى إلى الزيتية ، أو عند تغيير الميكروسكوب .

فى هذا التدريب سوف تقوم بضبط مقياس ميكرومتر العينية ، ثم تستعملها لقياس حجم أنواع نموذجية من الطحالب ، والبروتوزوا ، والخمائر ، والبكتيريا .



A ميكرومتر العينية داخل العدسة العينية . المسافات غير معروفة القياس

B الشريحة الميكرومترية المسافات معروفة كل قسم 10 um

C ميكرومتر العينية منطبق على الشريحة الميكرومترية ويمكن حساب طول القسم من ميكرومتر العينية

D استبدل الشريحة الميكرومترية بشريحة بكتيريا أخرى واحسب طول سلسلة البكتيريا السبحية

شكل (١) : ضبط مقياس ميكرومتر العينية واستخدامه فى قياس البكتيريا .
(ميكرون = ١ ميكرومتر = ١ × ١٠^-٦ متر) .

طـريقــة العمــل PROCEDURE

١ – فك العدسة العينية للميكروسكوب وضع بها ميكرومتر العينية على الرف المعدنى بداخل العدسة . اعد العدسة العينية وما بها من ميكرومتر العينية إلى مكانها بالميكرسكوب .

٢ – ضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب وثبتها بالقابض ، وبعد ضبط تدريج الشريحة الميكرومترية فى وسط مجال الفحص وذلك بواسطة العدسة الشيئية ذات القوى الصغرى ، افحص الشريحة الميكرومترية بالعدسة الزيتية .

٣ – ادر العدسة العينية إلى أن ينطبق خطان من ميكرومتر العينية على خطين من الشريحة الميكرومترية . عد الأقسام التى بين خطى الانطباق فى كلا المقاسين .

حيث أن كل قسم من أقسام الشريحة الميكرومترية يساوى ١٠ ميكرومتر ، فإنه يمكن تعيين طول القسم الواحد من أقسام ميكرومتر العينية . دون هذه الحسابات .

٤ – استبدل الشريحة الميكرومترية بالشرائح المختلفة المصبوغة المقدمة لك ، احسب طول وعرض كل خلية بميكرومتر العينية ، دوِّن نتائجك بالميكرومتر .

أســئلة QUESTIONS

١ – إذا لم تكن عندك شريحة ميكرومترية ، ماذا يمكنك أن تستعمله لتقييم ميكرومتر العينية ؟ اشرح ذلك ؟

٢ – ما هو طول الخلايا البكتيرية التى فحصتها بالسم ؟

الباب الثانى

زراعة الكائنات الدقيقة

THE CULTURE OF MICROORGANISMS

توجد الكائنات الحية الدقيقة فى الطبيعة ، فى مجتمعات خليطة من أنواع عديدة متباينة ، ومع ذلك فإن ما توصلنا إليه من معلومات فى الميكروبيولوجى ، جاء من دراسة الأنواع المعزولة النامية فى وسط خال من أى تلوث بالكائنات الأخرى . مثل هذه الطرق من الدراسة الفريدة فى نوعها ، لا تستعمل عادة فى دراسة النباتات والحيوانات الراقية ، ولكنها خاصة فقط بالدراسات المتعلقة بعالم الميكروبات .

تتطلب الكائنات الحية الدقيقة – مثل كل الكائنات الحية – وسطاً مناسبا للنمو به المغذيات المناسبة . أولا : يجب أن تحتوى البيئة المزرعية Culture medium على العناصر الغذائية اللازمة لنمو المزرعة الميكروبية . ثانيا : يجب أن توفر هذه البيئة فى نفس الوقت ، وسطاً مناسبا من حيث الرقم الايدروجينى ، الضغط الأسموزى ، الأكسجين الجوى ... وغيرها . وإذا ما فكرنا فى عدد المواد المختلفة التى تستطيع الميكروبات أن تتلفها ، فإنه سيتبين لنا أن مواد عديدة مختلفة تصلح كبيئة مزرعية . وعموما .. فإن البيئات المزرعية من حيث الشكل تقسم إلى : نوعين : بيئات سائلة (أو مرق أوبويون) Liquid or broth media ، وبيئات صلبة solid media .

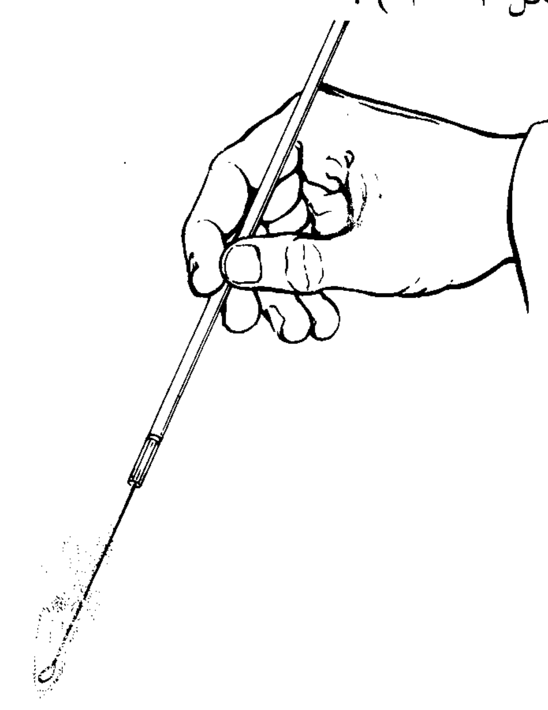
نظرا لأن معظم دراساتنا المعملية ستتم باستعمال مزرعة نقية من الميكروبات – أى على نوع واحد single species من الكائنات الدقيقة – فإنه يجب أن نكون قادرين على تعقيم البيئة والاحتفاظ بها فى صورة معقمة خالية من أى نوع من أنواع الكائنات . كما يجب أن نكون قادرين على تلقيح هذه البيئة المعقمة بمزرعة نقية للميكروب دون حدوث أى تلوث من الخارج . وتعرف الخطوة الأخيرة باسم طرق منع التلوث Aseptic technique .

نظرا لأن أية بيئة بعد تحضيرها تحتوى على كائنات دقيقة آتية من المكونات الداخلة فى تركيب البيئة ، أو من سطوح الأوانى والأدوات المستعملة ، لذلك فإن البيئة يجب أن تعقم sterilized ، أى تعامل بالحرارة ، أو بوسائل أخرى مناسبة لإبادة كل الميكروبات الموجودة بها ، وإلا فإن البيئة ستحتوى على خليط من الكائنات الدقيقة . وقبل إجراء عملية التعقيم فإن الأنابيب المحتوية على

البيئة ، يجب أن تغطى بسدادات من القطن ، أو بغطاء محوٍ مناسب من البلاستيك ، أو المعدن . لابد أن يمنع هذا الغطاء دخول كائنات جديدة تلوث البيئة ، وفى نفس الوقت يسمح بتبادل الهواء ، أو الغازات .

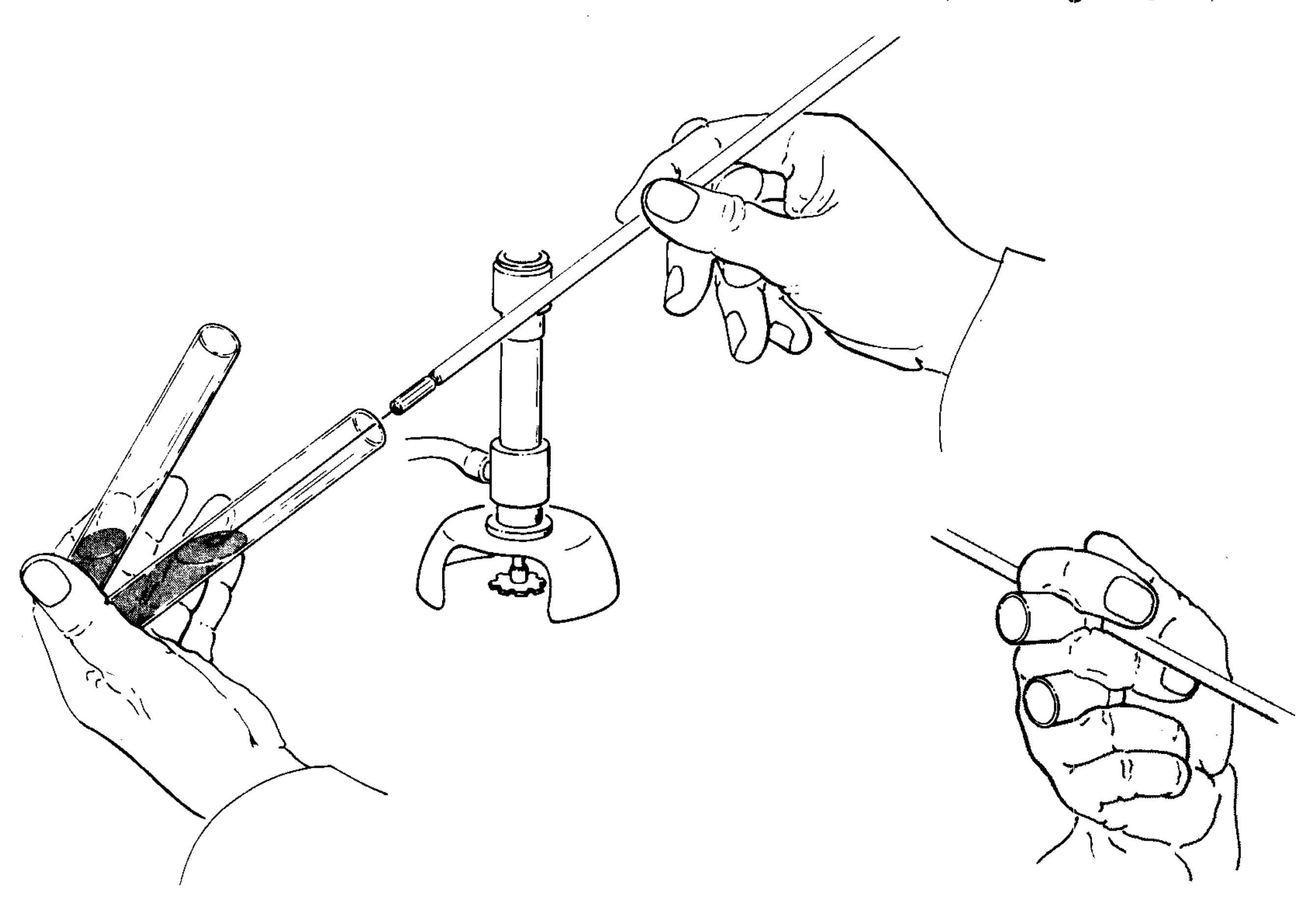
ولكى تنمو المزرعة البكتيرية فى البيئة المعقمة ، فإن عددا من خلايا البكتيريا يسمى باللقاح Inoculum ينقل إلى البيئة بواسطة إبرة التلقيح Inoculating needle (عملية التلقيح Inoculation) ، مع أخذ الاحتياطات المناسبة للمحافظة على نقاء المزرعة . ونظرا لأن عددا كبيرا من الميكروبات ينقل مع إبرة التلقيح إلى المزرعة ، فليس هناك ما يدعو إلى هز الإبرة بالمزرعة .

وعند عملية التلقيح ، يجب أن تسخن الإبرة المستعملة فى نقل الميكروبات على الفور قبل ، وبعد النقل ، وذلك بواسطة اللهب لدرجة الاحمرار . هذا التسخين لدرجة الاحمرار سيبيد كل الكائنات الحية الموجودة على سطح الإبرة . امسك مقبض الإبرة ، ثم ضع الإبرة فى اللهب لتسخينها وتسخين الجزء السفلى من مقبضها (انظر شكل ٢ - ١) .



شكل (٢ - ١) : سخن إبرة التلقيح فى اللهب حتى الاحمرار قبل وبعد التلقيح .

وأثناء عملية نقل اللقاح ، امسك الأنبوبة باليد اليسرى ، وبواسطة أصابع اليد اليمنى انزع غطاء الأنبوبة ، مع الحذر من إلقاء الغطاء ، أو وضعه على المنضدة . أثناء نقل اللقاح .. تكون الأنبوبة فى وضع أفقى تقريبا ولا تتركها مفتوحة مدة أكثر من اللازم . ويجب أن تمرر فوهات الأنابيب التى أخذت منها المزرعة ، أو التى نقلت إليها الميكروبات فى لهب الموقد على الفور قبل وبعد إدخال الابرة وإخراجها ، ثم تغطى الأنابيب وتوضع فى حاملها . وتعريض فوهة الأنبوبة للهب بالإضافة إلى أنه يبيد الميكروبات الموجودة على الفوهة ، فإنه يخلق تيارات حمل حرارية تقلل من احتمالات التلوث (انظر شكل ٢ - ٢) .



شكل (٢ - ٢) : الطريقة الصحيحة لمسك الأنابيب أثناء نقل المزارع .

ونظرا لأن أغلب أعمال البكتريولوجيين تتم من خلال استعمال مزارع نقية ، لذلك .. فإنه يجب عليك أن تقدر مدى أهمية الطرق المستعملة فى التلقيح ، الأمر الذى يحتم عليك أن تتقن هذه الطرق - مبكراً - من بداية المقرر العملى .

وعقب إجراء عملية التلقيح .. تحفظ المزرعة البكتيرية ، أو تحضن فى وسط مناسب للنمو . والمقصود هنا بالنمو growth هو : زيادة أعداد الخلايا من خلية واحدة ، أو من عدة خلايا قليلة .

وتصبح كتلة mass الخلايا الجديدة النامية مرئية للعين المجردة كتعكير Turbidity فى البيئة السائلة ، أو كمستعمرة Colony على البيئة الصلبة . ويستخدم مظهر النمو كوسيلة للتمييز بين أنواع الميكروبات .

والطريقة السهلة الشائعة لتحضير البيئة الصلبة هى إضافة مادة تصلب القوام Solidifying agent إلى البيئة السائلة ؛ فتتصلب البيئة عندما تبرد . من أكثر المواد المصلبة للبيئة استعمالا ، هى مادة الآجار Agar ، والآجار مادة تستخرج من بعض الطحالب البحرية ، ومن السهل تداولها بالمعمل ، ويمكن أن تتوفر بحالة جافة نقية ، وهى تضاف إلى البيئة السائلة قبل عملية التعقيم بالحرارة ، وتحفظ البيئة الصلبة الناتجة فى أنابيب اختبار ، أو دوارق .

رغم أن أنواع الآجار المختلفة تختلف بدرجة كبيرة فى خواصها الطبيعية ، إلا أنها تسيل عادة عند درجة ٩٧ - ١٠٠° م ، وبذلك فإنه عند الاستعمال ، يمكن تسييح بيئات الآجار الصلبة بالغليان . وتتصلب البيئة المحتوية على الآجار عندما تبرد إلى حوالى ٤٢° م . وتجرى عملية التلقيح قبل أن تتصلب البيئة على درجة ٤٥ - ٤٧° م ، وهى درجة غير ضارة لأغلب أنواع البكتيريا إذا ما تعرضت لها لمدة قصيرة . وبعد تصلب البيئة الملقحة ، فإنها تحضن Incubated على درجة الحرارة المطلوبة - حتى درجة ٧٠° م دون أن تسيل .

من الناحية الكيميائية .. فإن الآجار عبارة عن جالاكتان Galactan ، وهى مادة كربوهيدراتية معقدة تتكون من جزيئات الجالاكتوز ، ولا تتعرض للتحلل بفعل أغلب أنواع البكتيريا ويستعمل الآجار عادة بتركيز ١,٥٪ . وعند استعمال طريقة التخطيط السطحى فإن تركيز ١,٨٪ يعطى بيئة أكثر صلابة أقل عرضة للحفر والتقطيع بالإبرة أثناء التخطيط .

لا يستعمل الآجار بالبيئة كمصدر غذائى ، ولكن يستعمل فقط كعامل للتصليب . ومن العوامل المصلبة الأخرى التى يمكن استعمالها لأغراض معينة مادة الجيلاتين Gelatin ، التى تستعمل بتركيز ١٢ - ١٥٪ . ويوجد الجيلاتين فى الحالة السائلة عند درجة حرارة أعلى من ٢٥° م ، ويتعرض للتحلل (الإسالة) بتأثير أنواع كثيرة من البكتيريا .

من المواد المصلبة أيضا مادة السليكا جل Silica gel . وهى تستعمل فى تنمية البكتيريا الأوتوتروفية ، التى تتطلب أن تكون بيئتها خالية من المواد العضوية .

تهدف مجموعة التمارين التالية ، إلى تعريفك بأكثر أنواع البيئات المزرعية استعمالا (البويون - المرق المغذى Nutrient broth والآجار المغذى Nutrient agar) وكذلك استخداماتها فى زراعة البكتيريا Culture of bacteria . فى نفس الوقت فإنك ستتعلم أسس نقل المزارع الميكروبية تحت شروط التعقيم وطرق عزل المزارع النقية وطرق عد الميكروبات .

تدريـــب (٥)

المزرعة السائلة (البويون ، المرق) Broth Culture

الطريقة السهلة لتداول البكتيريا هى تنميتها فى مزرعة سائلة بأنبوبة اختبار . وتوجد تركيبات عديدة للمزارع السائلة ، وكلها تعتمد على البكتيريا التى ترغب فى تنميتها . عموما ، فإن كل المزارع السائلة يجب أن توفر للبكتيريا النامية الوسط الفيزيائى والكيميائى المناسب والعناصر الغذائية اللازمة وذلك فى محلول مائى .

يظهر النمو فى المزرعة السائلة بطرق مختلفة :

١ – تعكير Turbidity : حيث يكون النمو فى المزرعة السائلة على شكل سحابة مختلفة الكثافة .

٢ – تكون غشاء على السطح Pellicle formation : حيث تطفو على سطح المزرعة السائلة كتلة صغيرة من الخلايا .

٣ – راسب sediment : حيث توجد الخلايا راسبة فى قاع أنبوبة المزرعة السائلة ، وتتحرك لأعلى بالطرق الخفيف بالإصبع على الأنبوبة .

شكل (١) : طريقة طرق الأنبوبة بالإصبع لتعليق الراسب .

٤ – لزوجة slime : قد تظهر حالة اللزوجة إذا لم تنفصل الخلايا بعد تكونها بالقاع .

إذا ما تكون غاز ذائب بالمزرعة السائلة نتيجة النمو ، فإنه يتصاعد فى شكل فقاقيع غازية إذا ما رُجت الأنبوبة ، أو أدخلت فيها ابرة تلقيح ساخنة .

طريقة العمل PROCEDURE

استعمل أربع أنابيب محتوية على بيئة البويون المغذى لإجراء المعاملات الآتية :

١ – اترك أنبوبة بدون تلقيح كمقارنة control مع عدم نزع الغطاء .

٢ – انزع غطاء الأنبوبة الثانية وضف إليها كمية صغيرة من التراب ، أو من مادة غريبة أخرى . أعد الغطاء للأنبوبة .

٣ – بعد تعقيم إبرة التلقيح وفوهة الأنبوبة الثالثة باللهب ، لقح بمزرعة نقية من *Escherichia coli* . وبنفس الطريقة لقح الأنبوبة الرابعة بميكروب *Micrococcus luteus* .

٤ – حضن الأنابيب الأربع على درجة ٣٠° م حتى الدرس العملى التالى .

ملاحظـــات Observation

افحص أنابيب المزرعة السائلة للنمو البكتيرى . لاترج الأنابيب قبل أخذ ملاحظاتك الأولية عن تكون غشاء ، أو حدوث راسب . يتم النمو الكامل لمعظم أنواع البكتيريا بالمزرعة السائلة خلال ٢٤ – ٤٨ ساعة من التحضين .

ترسب تماما بعض الخلايا الثقيلة مثل الخمائر إذا ما تركت على حاملها بدون تحريك ، تاركة الجزء العلوى من المزرعة السائلة خاليا تقريبا من النمو ، وكاحتياط عام إذا أريد النقل من هذه المزرعة يجب التأكد من تحويل اللقاح إلى معلق بالمزرعة .

وبمجرد تعلمك الطريقة الصحيحة لتلقيح المزارع ، فإنه يجب أن تتمرن على الإسراع فى إتمام هذه العملية ، لأن أى تأخير فى إعادة الغطاء للأنبوبة سيزيد كثيرا من احتمالات التلوث .

أســـــئلة QUESTIONS

١ –متى يكون ضروريا مراعاة شروط التعقيم عند تلقيح أنبوبة مزرعة سائلة بأتربة ، أو قاذورات ؟

٢ –لماذا تتميز بعض الكائنات الدقيقة بأن نموها يكون فى صورة غشاء على سطح المزرعة السائلة ؟ ما هى الظروف البيئية التى يمكن أن تغير من تكوين الغشاء ؟

تدريـــب (٦)

الآجـــار المـــائـل
Agar Slope, Slant

الآجار المائل Agar slope, Slant عبارة عن أنبوبة اختبار تحتوى على بيئة آجار ، وضعت على سطح مائل أثناء تبريدها لتجميد الآجار . محتويات الأنبوبة المعاملة بهذه الطريقة تتصلب مكونة سطحا مائلا من السهل تلقيحه بإبرة التلقيح المستقيمة ، أو ذات العقدة .

ويوفر لنا الآجار المائل طريقة مناسبة لزراعة الكائنات الدقيقة خاصة الأنواع الهوائية ، واللاهوائية اختيارًا . كما أن الصفات المزرعية للكائنات النامية – مثل تكوين الصبغات – من السهل ملاحظتها على مزارع الآجار المائل .

وتعتبر طريقتى الآجار المائل Agar slope وآجار الوخز Agar stab – اللتين تستعملان فى زراعة الكائنات الدقيقة على المزارع الصلبة – من الطرق الشائعة فى حفظ المزارع الميكروبية Maintaining stock cultures (انظر الموضوع المعنون بحفظ المزارع المعملية) ، كما تعتبر طريقة آجار الوخز مفيدة عند الحاجة إلى توفير ظروف لاهوائية أكثر بالمزرعة .

طريقة العمل
PROCEDURE

١ – اصهر ثلاث أنابيب آجار مغذى فى ماء مغلى ، ثم برد الأنابيب على سطح مائل .

٢ – بعد تصلب الآجار ، لقح سطح آجار الأنبوبة الأولى بميكروب *Escherichia coli* باستخدام إبرة التلقيح . حرك الإبرة برفق على سطح الآجار من أسفل إلى أعلى . حاذر من الضغط على الإبرة حتى لا تجرح الآجار ، أو تقطعه .

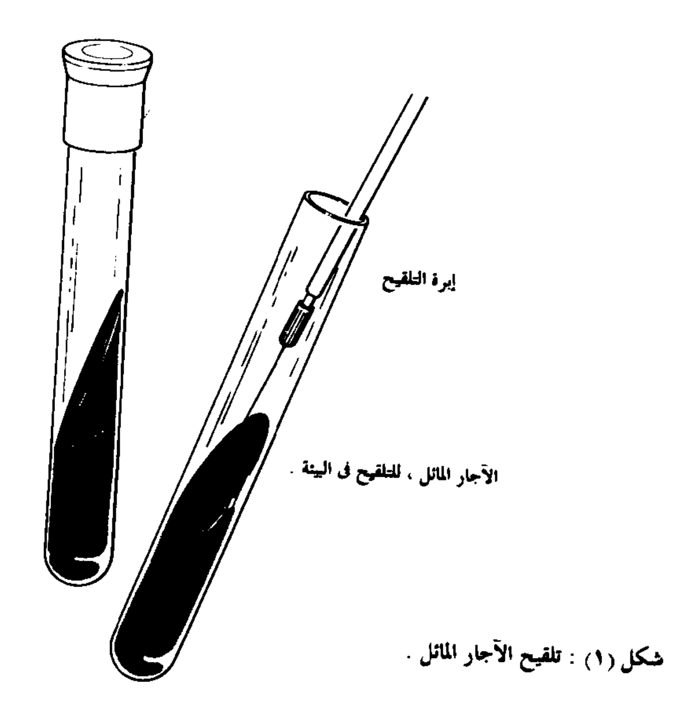
بنفس الطريقة لقح سطح أنبوبة الآجار الثانية بميكروب *Micrococcus luteus* .

اترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة .

٣ – حضن الأنابيب الثلاثة على درجة ٣٠°م حتى الدرس العملى التالى .

ملاحظـــات
Observation

افحص النمو السطحى المتكون . لاحظ طريقة النمو السطحى المتكون لبكتيريا *E-coli* على البيئة الصلبة والتى تختلف تماما عن تلك النامية فى المزرعة السائلة التى فحصتها بتدريب ٥ .



شكل (١) : تلقيح الآجار المائل .

QUESTIONS

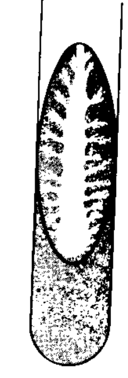
أســـئلة

١ – لماذا يجب الحرص على ألا تُحدث إبرة التلقيح حفراً أو جروحاً بسطح الآجار ؟

٢ – لماذا لا تستطيع البكتيريا – خاصة الأنواع المتحركة – النمو خلال كل بيئة الآجار المحتوية على ٩٧٪ ماء ؟

٣ – عند استعمال مزارع الآجار لدراسة الخواص المزرعية للبكتيريا ، فإنه يفضل فى عملية التلقيح استعمال الإبرة المستقيمة بدلاً من الإبرة ذات العقدة . لماذا ؟

شكل (٢) : أشكال مختلفة من النمو على الآجار المائل .













تـدريــــب (٧)

المـــــزارع النقــية Pure Culture Techniques

إن إضافة مادة مصلبة لمزرعة سائلة تحتوى على خلايا بكتيرية ، تجعل النمو الناتج من خلية واحدة يثبت فى مكانه . وبدلا من أن تطفو وتسبح الخلايا النامية فى البيئة السائلة ، فإنها فى حالة البيئة الصلبة تكوِّن مستعمرة Colony ثابتة تنمو لتكون كتلة مرئية . وعلى ذلك فإنه إذا ثبتت الخلايا الأصلية فى مكانها على مسافات متباعدة ، فإن كل خلية حية ، أو تجمع من الخلايا ، ينمو فى حالة منفصلة متباعدة عن الأخرى – هذه الحقيقة ذات أهمية عظمى وعلى أساسها توجد طرقا معينة على البيئات الصلبة توفر مزايا لايمكن الحصول عليها من المزارع السائلة .

لقد سبق لك استخدام البيئات الصلبة فى صورة آجار مائل فى مساحات محددة من أنبوبة الاختبار ، ولكن باستخدام البيئات الصلبة فى أطباق بترى الدائرية المتسعة ، فإن طرقا جديدة للتعامل مع المزارع الميكروبية ستصبح ممكنة .

تأمل على سبيل المثال ، المشكلة الخاصة بمحاولة فصل أنواع خليطة من البكتيريا موجودة فى مزرعة سائلة . فالخلايا صغيرة جدًّا لدرجة أنه لا يمكن التقاطها بحالة فردية إلا بطرق صعبة جدًّا تستعمل فيها طرق تخفيف غير مضمونة النتائج ، أو بطرق شديدة التعقيد لعزل خلايا بحالة فردية single-cell isolation . ومع ذلك ، فإذا أمكن إبعاد الخلايا عن بعضها بالتخفيف ، وتثبيتها فى مكانها بواسطة البيئة الصلبة ، وتركها لتنمو وتكون مستعمـرات ، لأمكـن عزلها فى أنابـيب مستقلـة تحتـوى على البيئة المغذية . بالإضافة إلى ذلك ، فإنه إذا حسبت التخفيفات بعناية ، وأجرى عد للمستعمرات النامية من تخفيف معين ، فإنه يمكن حساب أعداد البكتيريا الموجودة بالعينة الأصلية (ستجرى هذا التقدير فى تدريب قادم) .

ملاحظة

تختلف المستعمرات النامية فى الشكل ، والحجم ، والقوام ، واللون باختلاف أنواع الكائنات الدقيقة ، لذلك فإن مظهر المستعمرة يعتبر دليلا قيما للتعرف على المزرعة وللتأكد من نقاوتها .

فى التدريب التالى ، ستقوم بعزل مزارع نقية من البكتيريا باستخدام طريقة الأطباق المخطوطة وطريقة الأطباق المصبوبة .

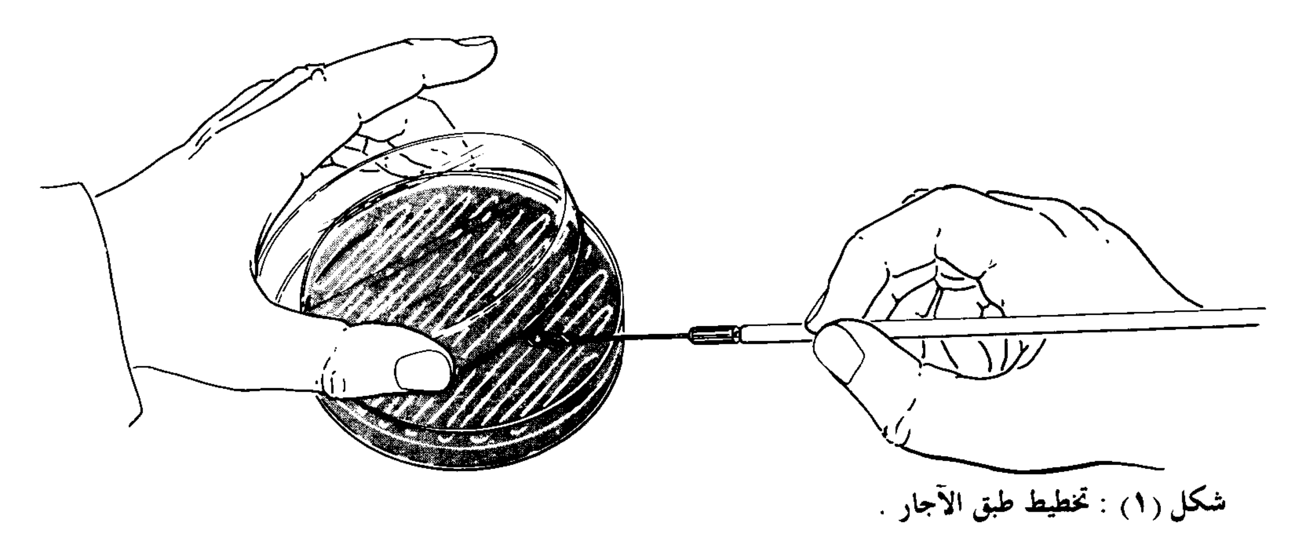
الأطبــاق المخطــوطة Streak-Plate

عندما تضع المزارع الميكروبية على سطح الآجار وتنشرها بواسطة أبرة ذات عقدة loop ، أو إبرة

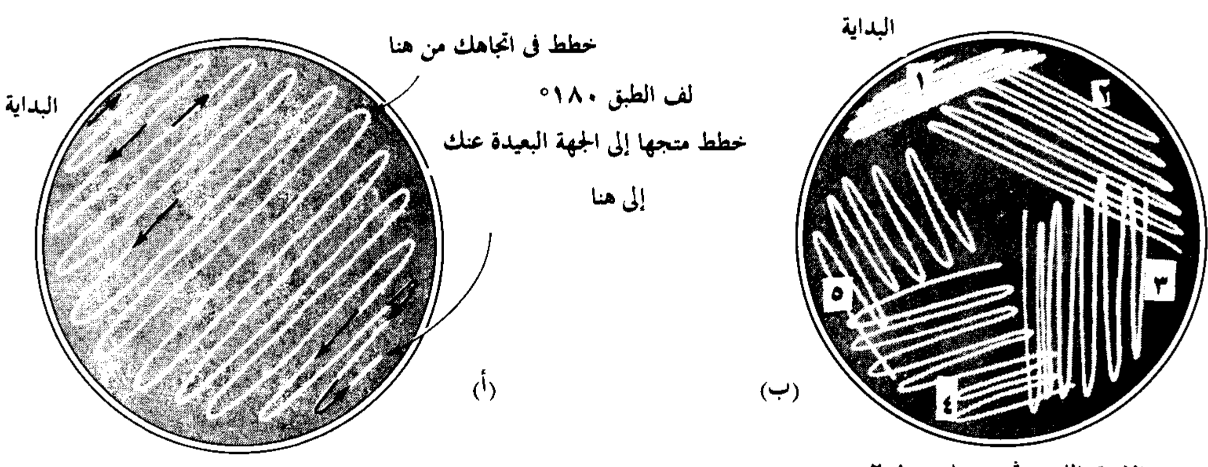
منحنية الطرف bent-needle ، فإن هذا يسمى تخطيط Streaking ، ويسمى الطبق المعد بهذه الطريقة طبقاً مخطوطاً streak-plate (انظر شكل (١)) .

يمكن عمل الأطباق المخطوطة بأكثر من طريقة ، وهنا طريقتان منها مشروحتان ومصورتان ، وكلتا الطريقتين تعطيان نتائج ممتازة إذا أجريتا بدقة (انظر شكل (٢)) .

الهدف المباشر من الأطباق المخطوطة هو الحصول من معلق البكتيريا المركز على مستعمرات منفصلة تماما . وعند التلقيح .. فإن الخلايا الكثيرة المتزاحمة الموجودة فى بداية التخطيط تكوّن مستعمرات قريبة جدًّا من بعضها ، ولكن باستمرار عملية التخطيط فإن أعدادا أقل فأقل تبقى بالقطيرات الموجودة على الإبرة ، وهذه عندما تصل إلى سطح الآجار فإنها تنمو فى مستعمرات منفصلة تماما ومتباعدة . وإذا عملت عدة خطوط قليلة متسرعة فإنها لن تكوّن مستعمرات متباعدة ، ويمكننا أن نحصل على طبق جيد التخطيط من تحرك الإبرة المستمر على سطح الآجار المتكرر لعدة مرات .



شكل (١) : تخطيط طبق الآجار .

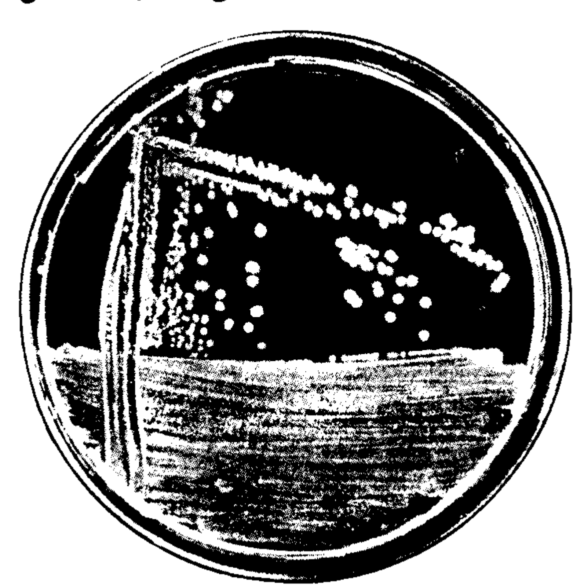


شكل (٢) : حركة إبرة التلقيح لتخطيط الأطباق بطريقتين .

فى كلتا الطريقتين ، تبدأ بقطرة من المزرعة من أحد حواف الآجار . فى الطريقة الأولى ، عقم إبرة التلقيح ذات العقدة (أو المنحنية الطرف) باللهب وبردها بلمس حافة الآجار . ثم المس بقطرة المزرعة التى بالإبرة ، وبما عليها من بكتيريا خطط سطح الآجار بادئا من الجهة البعيدة عنك من الطبق ثم سر بالإبرة فى إتجاهك ملامسا سطح الآجار ذهابا وإيابا من حافة إلى حافة مكونا خطوطا متوازية تبعد عن بعضها بحوالى نصف سنتيمتر – عندما تصل إلى منتصف الطبق ، لف الطبق ١٨٠ درجة واستمر فى التخطيط متجها إلى الجهة البعيدة عنك . هذا التغيير فى الاتجاه لتجنب تعارض الإبرة مع حافة الطبق . غط الطبق بغطائه الممسوك بيدك اليسرى .

فى الطريقة الثانية ، فإنك تبدأ أيضا بقطرة المزرعة ، اعمل خطين ، أو ثلاثة خطوط متوازية . ثم عقم الإبرة باللهب ، ثم اعمل خطين ، أو ثلاثة خطوط عمودية على مجموعة الخطوط الأولى . عقم الإبرة ثانية وكرر العملية . وبهذا فإنك تحقق نفس نتيجة الطريقة الأولى وهى تخفيف المزرعة .

بعد التحضين .. ستظهر المستعمرات المعزولة على مسارات بعض الخطوط .



شكل (٣) : مستعمرات بكتيرية متباعدة على طبق مخطوط .



شكل (٤) : طبق سئ التخطيط – لا تظهر به مستعمرات متباعدة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – أمامك ثلاثة أطباق بها بيئة آجار مغذى . بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة ، خطط بعناية الثلاثة أطباق من مزرعة خليطة – خطط الطبق الأول باستعمال الطريقة الأولى الموضحة فى شكل (٢) . وخطط الطبق الثانى بالطريقة الثانية .

اكتب بيانات طريقة التخطيط بقلم شمع على ظهر كل طبق لمساعدتك فى أخذ نتائج التخطيط .

٢ – بعد أن تفهمت أسس عملية تخطيط الأطباق ، صمم بنفسك طريقة وخطط بها الطبق الثالث .

٣ – حضن الأطباق مقلوبة (الغطاء إلى أسفل) على درجة ٣٠° م حتى الدرس العملى التالى .

الغرض من قلب الأطباق هو تجنب تكاثف الماء على الغطاء من الداخل ثم سقوطه على المجاميع البكتيرية النامية ، فيسبب انتشارها وتداخلها مما يصعّب عملية الفصل .

ملاحظة

راعى باستمرار ضرورة كتابة بطاقة على كل طبق بترى مدّون عليها اسمك وبيانات العملية التى أجريت وتاريخها .

٤ – بعد التحضين افحص النمو المتكوّن على سطح الآجار . لاحظ الاختلافات الموجودة بين المستعمرات من حيث الشكل والحجم والمظهر . وهل نجحت طريقتك الخاصة فى التخطيط فى عزل مستعمرات فردية ؟

الأطباق المصبوبة Pour-Plate

توفر لك طريقة الأطباق المصبوبة طريقة ثانية للحصول على مزرعة نقية من مزرعة خليطة . وهى تختلف عن الأطباق المخطوطة فى أن بيئة الآجار تلقح وهى مازالت فى حالة سائلة (لكن مبردة عند ٤٥° م) . وعلى ذلك فإن المستعمرات تتكون فى البيئة وليس على السطح فقط – ويعتبر هذا ميزة فى بعض الحالات ، مثل : دراسة تأثير مستعمرة الستربتوكوكاى على كرات الدم الحمراء . بالإضافة إلى ذلك ، فإن طريقة الأطباق المصبوبة المنفذة بإتقان ، تمكننا من الحصول على توزيع منتظم للمستعمرات ، ومن سهولة عمليات العزل .

عند صب خلايا المستعمرة الخليطة بالأطباق ، ستقابلنا صعوبة فى الحصول على التركيز المناسب من خلايا البكتيريا بالأطباق المصبوبة . فهل ستكون الأطباق شديدة الازدحام بالمستعمرات النامية ، فتصبح تلك الأطباق عديمة الفائدة ؟ أم ستكون هناك أطباق بدون مستعمرات نامية بها نهائيا ؟

وليست هناك طريقة دقيقة للتنبؤ بعدد الخلايا الحية الموجودة فى عينة ما ، مثل : عينة اللبن ، معلق التربة ، مزرعة بكتيرية عمرها ٢٤ ساعة . لذلك فإنه يجب أن تقوم باستمرار بعمل تخفيفات عديدة من العينة ، وصب أطباق عديدة أيضا . وعليك أن تتوقع أنك ستحصل فقط على طبق واحد ، أو اثنين بهما أعداد مناسبة من المستعمرات . وعموما .. فإن ما ستكتسبه من خبرة فى عينة معينة ، سيمكنك من تقليل عدد التخفيفات الزائدة عن الحاجة .

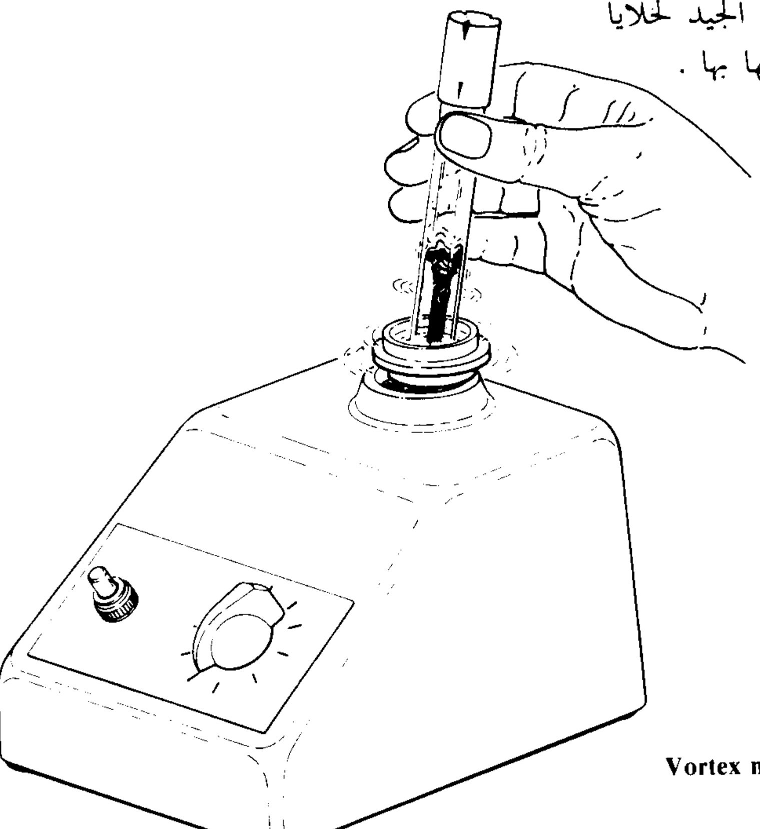
وطريقة التخفيف بالإبرة ذات العقدة loop-dilution procedure ستمكنك عادة من الحصول على أطباق ذات تخفيفات مناسبة ، والأساس فى هذه الطريقة ، هو عمل تخفيفات كمية بشكل تقريبى من العينة الأصلية ، وذلك فى بيئة الآجار .

طريقـــة العمـــل PROCEDURE

١ - امامك ثلاث أنابيب من الآجار المغذى العميق . اصهر الآجار ثم برده إلى درجة ٤٥ - ٤٧°م .

٢ - تحت شروط التعقيم ، انقل ما يعلق بعقدة غمسة إبرة واحدة (مرة واحدة) من مزرعة بكتيرية خليطة إلى أنبوبة الآجار الأولى .

اخلط اللقاح جيدًا بالبيئة بالطَّرْق على الأنبوبة بإصبع السبابة ، أو بلفها بين الكفين عدة مرات ، أو باستعمال خلاط فورتكس Vortex mixer (انظر شكل (٥)) . علما بأن نجاح هذه الطريقة يعتمد على المزج الجيد لخلايا البكتيريا بالبيئة وانتظام توزيعها بها .



شكل (٥) : استعمال خلاط فورتكس Vortex mixer

٣ – من الأنبوبة الأولى ، انقل ٢ غمسة إبرة (مرتين) إلى أنبوبة الآجار الثانية . اخلط جيدًا .

٤ – من الأنبوبة الثانية ، انقل ٣ غمسة إبرة (ثلاث مرات) إلى أنبوبة الآجار الثالثة واخلط جيدًا .

يجب مراعاة أن تتم هذه الخطوات بسرعة لتجنب تصلب الآجار وتعذر صبها بالطبق ، وذلك بسبب انخفاض درجة الحرارة السريع من درجة ٤٥° م إلى درجة ٤٢° م . ويمكن تجنب ذلك باستعمال حمام مائى مضبوط على درجة ٤٥° م ، وحفظ الأنابيب به حتى صبها .

٥ – صب كل أنبوبة فى طبق بترى مستقل ، حرك الطبق بعد صبه برفق حركة دائرية منتظمة لنشر الآجار بانتظام بالطبق وتوزيع الميكروبات به . اترك الطبق ليتجمد(*) .

٦ – حضن الأطباق مقلوبة على درجة ٣٠° م حتى الدرس العملى التالى .

٧ – افحص المستعمرات النامية على الأطباق المختلفة .

فى الأطباق المزدحمة .. فإن المستعمرات النامية تميل لأن تكون صغيرة جدًا ومتصلة ببعضها ، لدرجة أن النمو يظهر فى شكل سحابة معتمة – أما المستعمرات المنفصلة جيدا عن بعضها ، أى المنعزلة تماما ، فإنها تكون أكبر وأوضح ، وأكثر تميزاً فى الشكل ، والتركيب ، واللون ، والقوام – كما يلاحظ أن المستعمرات النامية على السطح – نتيجة التوزيع العشوائى – تكون منتشرة spread out ، كبيرة ، دائرية غالبا circular . وعلى العكس من ذلك ، فإن المستعمرات النامية فى عمق الآجار تكون صغيرة نسبيا ، وعدسية الشكل (⊂) Lenticular ، وهذا نتيجة الظروف المحددة للنمو فى عمق الآجار .

فى حالة المجاميع الخليطة من الكائنات الدقيقة الموجودة بالمصادر الطبيعية (مثل المحتويات المعوية ، خضر متخمرة ، تربة ... إلخ) ، يلاحظ أن بعض الأنواع توجد بأعداد كبيرة جدًا عن أعداد أنواع

(*) يجب أن تتخذ احتياطات عديدة لمنع التلوث :

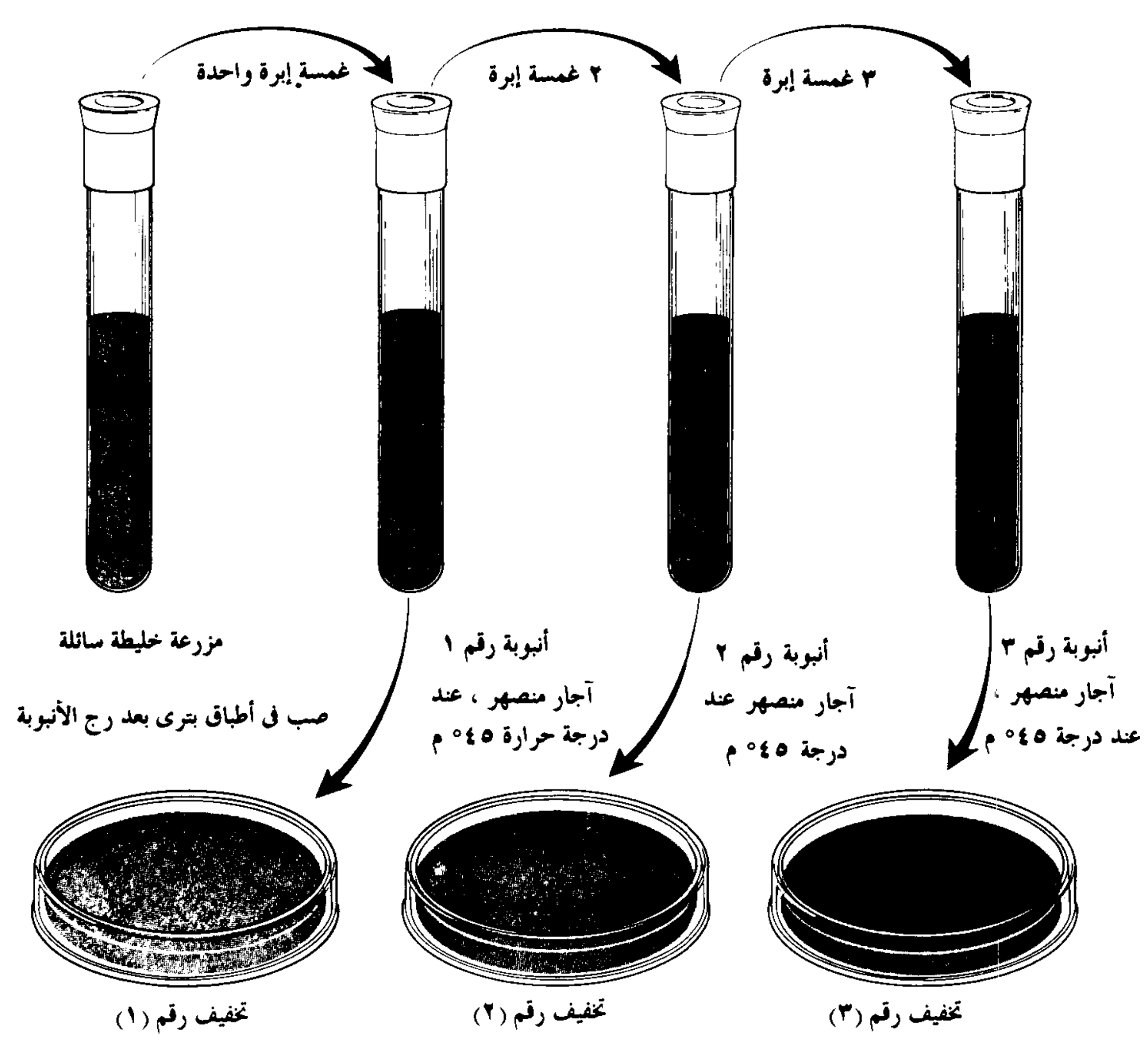
أولا : عند أخذ أنابيب الآجار المنصهرة من الحمام المائى ، تمسح الأنبوبة من الخارج بقماش ، أو ورق تنشيف ، وإلا فإنه عند صب أنابيب الآجار فى الأطباق ، فإن الماء سينزل إلى الأطباق ويسبب تلوثا .

ثانيا : عند نزع غطاء الأنبوبة لصب الآجار ، عقم فوهة الأنبوبة باللهب لقتل الميكروبات الموجودة عليها .

عند صب الآجار من الأنبوبة إلى الطبق ، ارفع غطاء الطبق بيدك اليسرى من جهة واحدة فقط بقدر ما يسمح بإدخال فوهة الأنبوبة (انظر شكل (٧)) ودون أن تحتك الأنبوبة بالطبق ، أو بغطائه .

بعد صب الآجار ، غط الطبق بسرعة ، امسك الطبق وحركه حركه دائرية منتظمة (أو رج برفق من جانب لآخر) لتضمن تجانس توزيع الآجار على قاع الطبق .

ضع الطبق على المنضدة واتركه حتى يتجمد الآجار تمامًا .

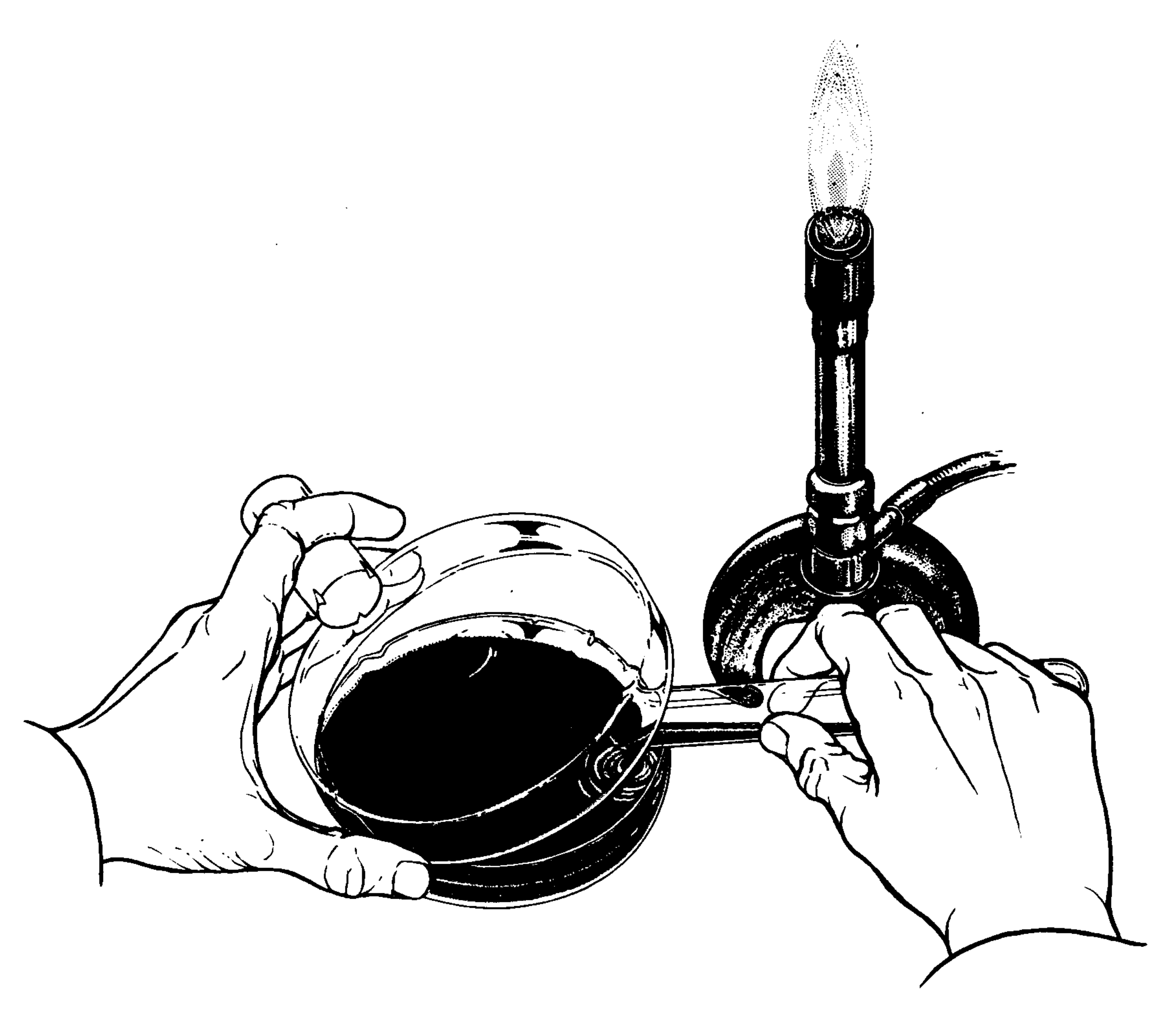


شكل (٦) : طريقة التخفيف بالإبرة ذات العقدة .

أخرى . وهذا يمثل نقطة ضعف بالنسبة لطريقة التخفيف المستعملة لأغراض العزل . فالكائنات الموجودة بأعداد صغيرة ستخفف إلى الدرجة التى تناسب تخفيف أعداد الأنواع السائدة المزدحمة . لهذا .. فإنه لعزل الأنواع غير السائدة ، قد يستعمل – فى بعض الحالات – بعض مواد كيميائية مانعة لنمو الأنواع السائدة . وهذا سيسمح بنمو الأنواع غير السائدة ، وبذلك يصلح عزلها من التخفيفات البسيطة (انظر تدريب ٤٣) .

عزل مزرعة بكتيرية Isolation of a Bacterial Culture

بعد أن أعددت بنجاح الأطباق المخطوطة والمصبوبة ، عليك الآن أن تنقل خلايا من مستعمرات مختلفة ، متباعدة تماما عن بعضها ، إلى أنابيب بيئة البويون المعقمة . بعد التحضين .. فإن هذه الخلايا المنقولة إلى البيئة تنمو مكونة مزارع نقية ، بمعنى أنها خلايا لنوع واحد single species من الميكروبات . يجب أن تختبر نقاوة هذه المزارع ، بالتخطيط على طبق بترى ، فإذا كانت كل المستعمرات النامية على هذا الطبق لها نفس المظهر ، فإنه من المحتمل أن تكون قد حصلت على مزرعة نقية .



شكل (٧) : صب طبق الآجار .

طريقــة العمــل
PROCEDURE

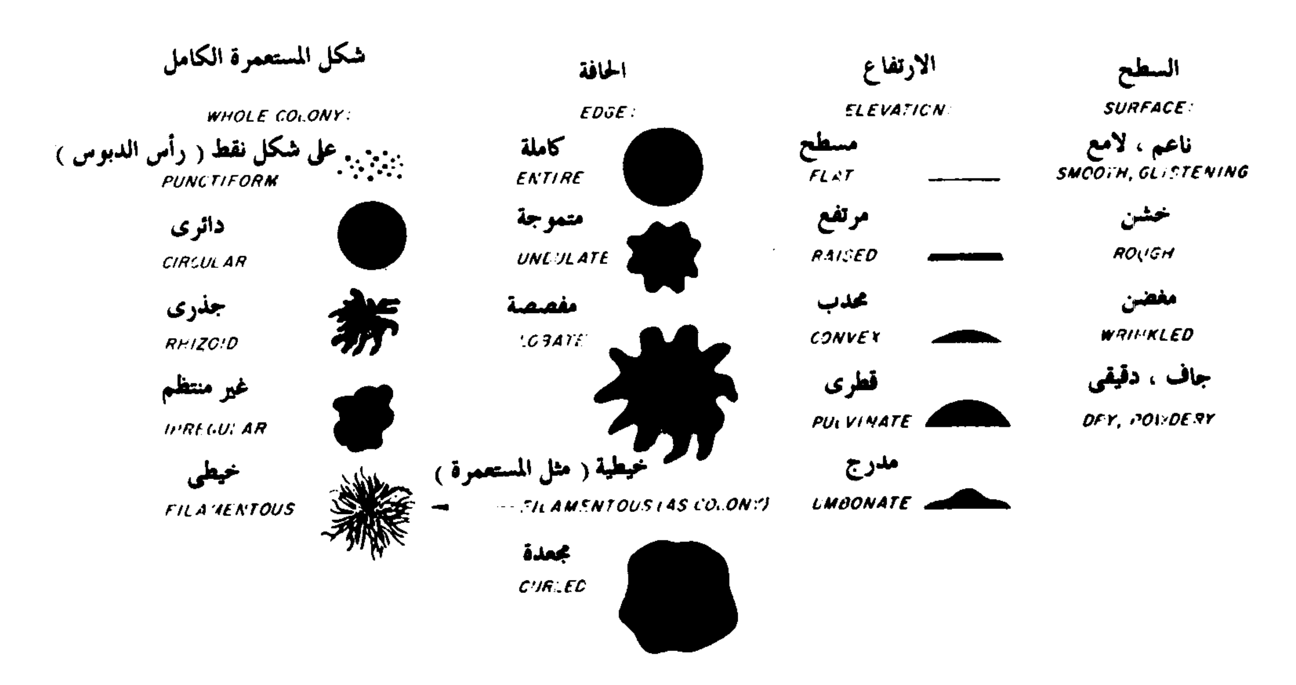
١ – من الأطباق المخطوطة ، أو المصبوبة التى قمت بإعدادها (أو من البيئة السائلة) ، اختر ثلاث مستعمرات واضحة الاختلاف (مستعمرتين سطحيتين ومستعمرة تحت سطحية) . عَلِّم مكان هذه المستعمرات بقلم أحمر من أسفل الطبق .

٢ – عقم إبرة التلقيح المستقيمة باللهب وبردها للحظة ، ارفع غطاء طبق البترى ، المس بالإبرة المستعمرة المطلوب عزلها ، انقل جزءًا بسيطاً من المستعمرة إلى أنبوبة بويون مغذى معقم ، راعى شروط التعقيم مع تعقيم فوهة أنبوبة البيئة قبل وبعد التلقيح .

كرر ما سبق للمستعمرتين الأخريتين .

٣ – رقّم كل أنبوبة برقم يميزها ، ثم حضن الأنابيب على درجة ٣٠°م حتى الدرس العملى التالى لاستعمال هذه المزارع فى تمارين الصبغ . دون ملاحظات النمو فى ورق التقرير الخاص . يوضح شكل (٨) بعض أنواع من المستعمرات والتسميات الخاصة بأوصافها .

٤ – أثناء الدرس العملى التالى .. خطط من كل مزرعة سائلة ، طبق بترى به بيئة آجار مغذى . إذا ما كان مظهر كل المستعمرات النامية بالطبق متشابها ، فإنه من المحتمل أن تكون قد حصلت على مزرعة نقية .



شكل (٨) : دليل للمصطلحات المستعملة لأوصاف المستعمرة .

أسـئلة
QUESTIONS

١ – لماذا تبرد الآجار المنصهر إلى درجة ٤٥ – ٤٧°م قبل عملية صب الأطباق ؟

٢ – ما هى العوامل التى تؤدى إلى وجود اختلافات فى مظهر كل من :
(أ) المستعمرات المتباعدة المنعزلة عن المستعمرات المزدحمة ؟
(ب) المستعمرات السطحية عن مستعمرات تحت السطح ؟

٣ – ما هى العوامل التى تحدد حجم مستعمرة البكتيريا ؟

يوضح شكل (٩) شكل مستعمرات نامية من مزرعة خليطة .



شكل (٩) : مزرعة خليطة .

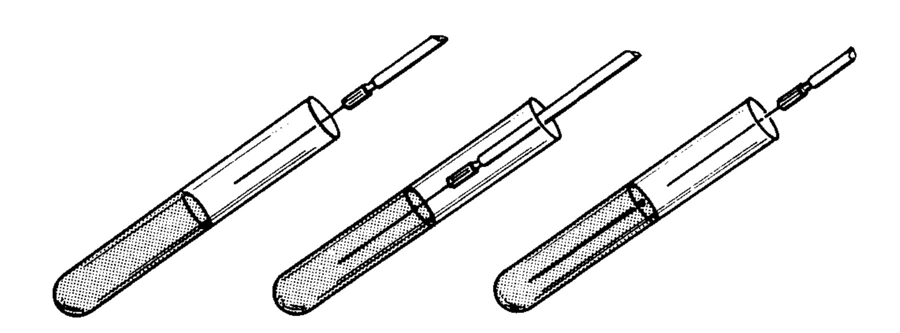
حفظ المزارع المعملية

PRESERVATION OF LABORATORY CULTURES

تحفظ المزارع البكتيرية بالمعمل لحين طلبها ، وذلك لتجنب النقل المتكرر للمزرعة sub-culturing ؛ أى نقل المزرعة على فترات متكررة إلى بيئات مزرعية حديثة التحضير . ولكى تكون وسيلة الحفظ مناسبة ، فإنها يجب أن تكون ملائمة للمحافظة على أقصى نمو للبكتيريا مع أقل (أو بدون حدوث) تغيرات وراثية وفسيولوجية – والأساس فى عمليات حفظ المزارع هو الاعتماد على ظاهرة إيقاف النمو البكتيرى Bacteriostasis ، بمعنى المحافظة على المزرعة بدون نمو ، أو تكاثر ، وللوصول إلى حالة السكون المطلوبة Dormancy ، فإن أغلب طرق الحفظ تعتمد على استخدام التبريد refrigeration ، أو التجفيف Desiccation ، أو الاثنين معا .

يمكن الحفظ لفترات قصيرة بطرق عديدة تختلف باختلاف خواص النوع البكتيرى المطلوب حفظه . فالبكتيريا الهوائية يمكن حفظها لمدة شهور على الآجار المائل المبرد Refrigerated agar slope (انظر تدريب ٦) . أما بعض البكتيريا اللاهوائية اختيارا والتى يؤذيها وجود الأكسجين ، فإن الحفظ المناسب لها يكون فى مزارع آجار الوخز المبردة Refrigerated agar-stap . ويحضر آجار الوخز كما هو موضح فى الشكل (٢ – ٣) ، وبهذه الطريقة ، تترك أنبوبة الاختبار المحتوية على الآجار المنصهر المعقم ، لتتصلب وهى فى وضع رأسى ، ثم تلقح بوخز الإبرة المستقيمة فى منتصف الآجار موازية لجدار الأنبوبة . وأثناء التحضين يتكون مخروطا من النمو core of growth موضع وخز الابرة . ولاستبعاد الأكسجين ومنع التبخير ، يوضع على سطح آجار الوخز طبقة من زيت معدنى معقم بسمك ١ سم ، بعدها تحفظ المزرعة بالثلاجة . تلقح وتحفظ الميكروبات اللاهوائية حتما فى بيئة شديدة الاختزال مثل بيئة الثيوجليكولات السائلة Thioglycollate (انظر تدريب ٢٦) .

إذا كانت الميكروبات المحفوظة من النوع الذى يَكُون فيه الحامض من نواتج التمثيل الغذائى .. فإن البيئة المستعملة يجب أن تضاف إليها المنظمات Buffers بالدرجة المطلوبة .

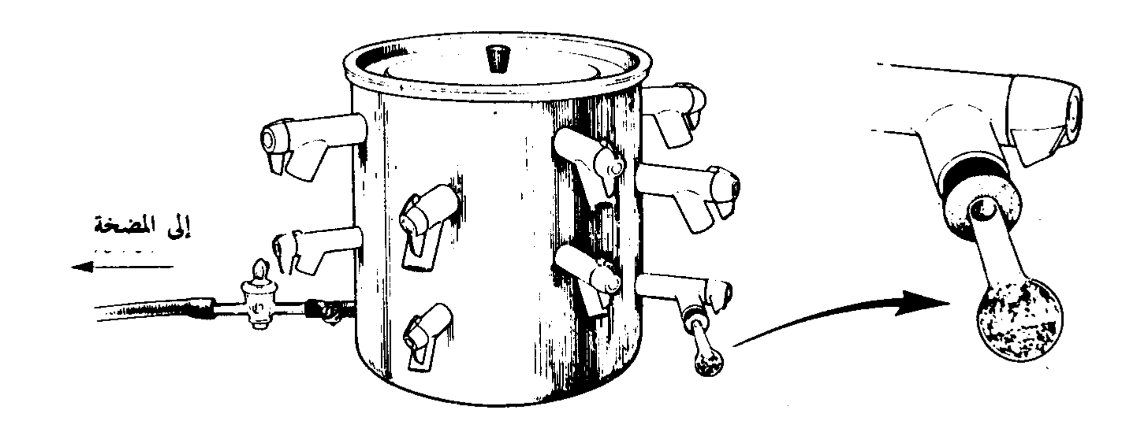


شكل (٢ - ٣) : تحضير مزرعة آجار الوخز .

رغم أن المزارع - من النوع المذكور سابقا - المحفوظة بالتبريد ، تبقى حية لعدة شهور ، إلا أن الحفظ بالتبريد لايصلح لحفظ المزارع لمدد طويلة . لأن مثل هذه المزارع المحفوظة stock cultures يجب أن تعاد زراعتها Recultured بشكل دورى ، وأيضا لأنه - وهذا أكثر أهمية - قد تحدث طفرات بالمزارع المحفوظة بالتبريد لفترات طويلة - مثل هذه العقبات يمكن التغلب عليها باستعمال طرق أخرى مناسبة للحفظ . على سبيل المثال .. فإن الخلايا التى تبقى حية survive تحت ظروف التجميد ، أو التجفيف ، يمكن أن تحفظ فى حالة ساكنة dormant state لفترات طويلة بالتجميد ، أو التجفيف . ومن سوء الحظ ، فإن أنواعا ميكروبية كثيرة لاتبقى حية تحت ظروف التجميد العادى ، أو التجفيف ، إلا أن معظم المزارع البكتيرية تستطيع أن تبقى حية بصورة جيدة إذا جمدت فى لبن عباد الشمس ، أو خلطت بنسبة ١ : ٢٠ بالجليسرول المعقم وحفظت على درجة - ٢٠°م ، أو أقل . ويمكن زيادة فترة التخزين بسد الأنابيب المحتوية على الخلايا وحفظها عند درجة من - ١٠٠ إلى - ٢٠٠°م فى عبوات النيتروجين السائل .

والطريقة الشائعة لحفظ الميكروبات لفترات طويلة هى طريقة التجفيد Lyophilization, Freeze-drying . وفى هذه الطريقة .. يعمل معلق للمزرعة الميكروبية فى بيئة معقمة من اللبن ، أو سيروم الدم (أو مواد مشابهة تضاف للمعلق الخلوى لحمايته ضد التجميد) وذلك فى أنابيب ، أو أمبولات زجاجية صغيرة Vials ، ثم تجرى عملية تجميد سريع Quick-freezing للمزرعة فى خليط من الثلج الجاف ، والكحول . ثم تجفف المزرعة بعناية desiccated وهى فى حالتها المجمدة ، لكى يتسامى الماء ولا يحدث تكسير للخلايا .

وفى النهاية .. تلحم الأمبولات المحتوية على المزرعة المجففة (انظر شكل ٢ - ٤) .



شكل (٢ - ٤) : تجفيد المزرعة .

ومثل هذه المزارع المجفدة ، يمكن أن تحفظ فى أمبولاتها لسنوات عديدة . ويلاحظ أنه فى طريقة التجفيد ، فإن نسبة عالية من الميكروبات تبقى حية ، وعلى ذلك فقليلا ما يحدث - أو لا يحدث إطلاقا - عملية انتخاب Selection بالمزرعة للأنواع الوراثية الأكثر مقاومة More-resistant genetic variants . ويعود السبب فى ارتفاع نسبة الميكروبات التى تبقى حية بطريقة التجفيد عن الطرق الأخرى ، إلى التأثير المشترك الناتج من وجود مواد حامية بالبيئة ومن عملية تجفيف المزرعة وهى فى حالة مجمدة* .

* تحفظ الهيئة الأمريكية التالى اسمها وعنوانها ، بأعداد كبيرة من الكائنات المجهرية الدقيقة ومن الفيروسات ، وهى ميسرة بأسعار رمزية لمن يطلبها من العاملين بالميكروبيولوجى .

The American Type Culture Collection,
12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A.

الباب الثالث

صبغ الكائنات الدقيقة

THE STAINING OF MICROORGANISMS

طرق الصبغ البسيط SIMPLE STAINING TECHNIQUES

يمكن إجراء الفحص المورفولوجى لخلايا البكتيريا بطريقتين :

١ - بفحص الخلايا الحية دون صبغها ، كما يحدث فى فحص حركة البكتيريا .

٢ - بفحص الخلايا الميتة المصبوغة بالصبغات .

والبكتيريا الحية عديمة اللون تقريبا ، وتباينها مع الوسط المائى المعلقة به لايكفى لرؤيتها بوضوح ، لذلك فإن صبغ البكتيريا يجعلها تتباين contrast فى اللون عن الوسط الموجودة به ، فتصبح مرئية ويسهل تمييزها . كما تستعمل أيضا بعض الصبغات لتمييز التركيبات الداخلية للخلايا Internal structures والتى بدون صبغها تكون غير مرئية - وبالإضافة إلى ذلك ، فإنه لكى تستخدم العدسة الزيتية فى الفحص للوصول إلى أكبر درجة تكبير ، فإنه من الأنسب استعمال تحضيرات مصبوغة stained preparations عن استعمال التحضيرات المبتلة wet mounts .

رغم أن البكتيريا لاتبدو مختلفة بدرجة كبيرة عن الوسط المحيط بها ، إلا أنها تختلف عنه كثيرا من الناحية الكيميائية . هذه الاختلافات الكيميائية بين البكتيريا والوسط ، هى التى تمكننا من تمييز البكتيريا بواسطة الصبغ ، فالصبغة تتحد غالبا مع الخلية البكتيرية وليس مع الوسط المحيط .

وعلى ذلك فإن المزايا الرئيسية للصبغ هى :

١ - توفير التباين بين الكائنات الدقيقة وبين الخلفية الموجودة فيها Background ؛ مما يسمح بالتمييز بين الأنواع المورفولوجية المختلفة .

٢ - تسهيل دراسة التركيبات الداخلية للخلايا البكتيرية ، مثل : جدار الخلية ، الفجوات vacuoles ، والأجسام النووية .

٣ – تمكين البكتريولوجى من استعمال قوة تكبير أعلى .

وتستخدم الأنواع المختلفة من الصبغات dyes المتاحة الآن للعاملين فى مجال البكتريولوجى ، بطرق متعددة للصبغ القاعدى basic staining :

١ – صبغات بسيطة — Simple stains

(أ) صبغات قاعدية — Basic dyes

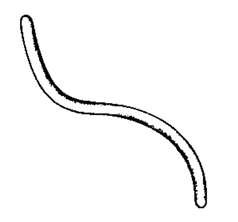
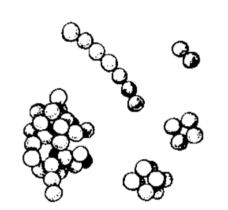
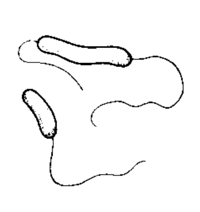
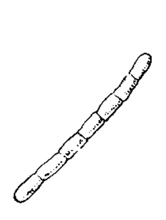
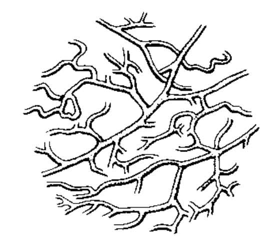
(ب) صبغات حامضية — Acidic dyes

(جـ) صبغات غير محددة التأثير — Indifferent dyes

٢ – صبغات مركبة (تفريقية) — Differential stains

(أ) صبغة جرام — Gram stain

(ب) الصبغة الصامدة للأحماض — Acid-fast stain

(١) للتمييز بين الأشكال المختلفة للكائنات الحية الدقيقة .



(٢) للتمييز بين التركيبات المختلفة للخلية .

(٣) لإمكان استعمال قوى تكبير أعلى

شكل (٣ – ١) : أسباب استعمال التحضيرات المصبوغة .

٣ – صبغات فحص تركيب الخلية — Structural stains

(أ) صبغة فولجين (لصبغ المادة النووية) — Feulgen stain

(ب) صبغة الجراثيم الداخلية — Endospore stain

(جـ) صبغة جدار الخلية — Cell-wall stain

(د) صبغة الكابسول (العلية) — Capsule stain

(هـ) صبغة الفلاجلات — Flagella stain

تـدريـــب (٨)

الصبغ المباشر بالصبغات القاعدية

Direct Staining With Basic Dyes

لكى نفهم كيف تقوم الصبغة بصبغ خلية البكتيريا ، يجب أن تعرف أولا ماهى الصبغة . الصبغات Dyes هى : بصفة عامة عبارة عن أملاح أحد أيوناتها ملون . الملح عبارة عن مركب يتكون من أيون موجب الشحنة وأيون سالب الشحنة . فصبغة أزرق المثيلين Methylene blue صبغة بسيطة ، عبارة عن كلوريد الميثلين الأزرق ، والتى تتفكك dissociate كالآتى :

كلوريد المثيلين الأزرق ← ميثيلين أزرق$^{+}$ + كلوريد$^{-}$.

ولون الصبغة هنا هو أيون المثيلين الأزرق ذو الشحنة الموجبة .

وتحمل خلايا البكتيريا شحنات سالبة عندما يكون الرقم الأيدروجينى للوسط قريباً من التعادل ، وهو الوسط المعتاد غالبا لنمو البكتيريا . وتتحد الخلايا البكتيرية ذات الشحنة السالبة مع أيون المثيلين الأزرق الموجب الشحنة مما يؤدى إلى صبغ الخلية ، وعلى ذلك فالاختلافات فى الشحنة هى التى تكوّن حالة قابلية الارتباط affinity بين الصبغة وبين خلية البكتيريا .

تقسم الصبغات البكتيرية إلى مجموعتين : قاعدية ، وحامضية . فإذا كان اللون يعود إلى الأيون الموجب فى الصبغة (الكاتيون) فإنها تسمى صبغة قاعدية Basic dye ، وعلى ذلك ، فإن المثيلين الأزرق يعتبر صبغة قاعدية ، وإذا كان اللون يعود إلى الأيون السالب (الأنيون) ، فإن الصبغة تسمى صبغة حامضية Acidic dye .

فى التدريب التالى ، ستحضر أغشية مصبوغة من المزارع التى عزلتها فى تدريب ٧ وكذلك من اللعاب saliva .

طـريقـــة العمــــل PROCEDURE

تحضير وتثبيت التحضير البكتيرى للصبغ

Preparation and Fixation of Bacteria for Staining

قبل إجراء عملية الصبغ ، عليك أن تثبت المادة التى ستفحصها ، بمعنى أن تلتصق المادة بسطح الشريحة التى ستصبغ عليها . وإذا لم يثبت التحضير ، فإن غشاء Film الخلايا سيزول من على الشريحة أثناء عملية الصبغ .

والطريقة العامة الموضحة فى هذا التدريب ، تعتبر أساسية فى معظم طرق الصبغ المستعملة للبكتيريا . ففى هذا التدريب ستستعمل الحرارة لقتل الخلايا وتثبيتها على الشريحة .

١ – بواسطة الإبرة ذات العقدة ، ضع غمسة إبرة من كل مزرعة سائلة عزلتها فى تمرين ٧ على سطح شريحة نظيفة(*) مستقلة وذلك لكل غمسة . وفى حالة المزرعة الصلبة ، ضع نقطة ماء نظيفة فى وسط الشريحة وامزج بها جيدًا جزءًا صغيرا من المزرعة .

٢ – انشر بالإبرة مزيج المزرعة الصلبة (أو غمسة المزرعة السائلة) على مساحة حوالى ١ سم^{2} بوسط الشريحة ، لتكون غشاء رقيقًا thin film ، ومعظم الطلاب يقعون فى خطأ تحضير غشاء سميك .

٣ – اجمع بعض اللعاب فى أنبوبة اختبار معقمة ، وبالإبرة المعقمة ذات العقدة انقل غمسة إبرة من اللعاب على سطح شريحة نظيفة وانشره لعمل غشاء رقيق .

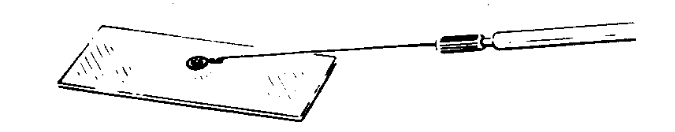
٤ – اترك الشريحة لتجف فى الهواء ، أو بمسك الشريحة أعلى اللهب بحوالى ٢٠ سم بحيث لا يغلى الغشاء الموجود على الشريحة .

٥ – بعد ذلك ثبت الغشاء المتكوّن بتمرير الشريحة فى اللهب ثلاث مرات ، مراعيًا وجود الغشاء على السطح العلوى .

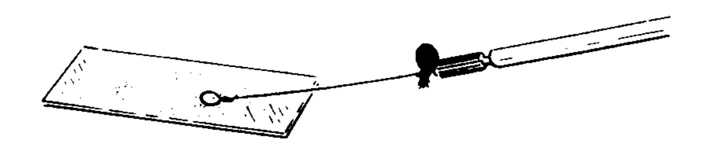
يراعى فى هذه الخطوة ، أن استعمال الحرارة أكثر من اللازم سيشوه شكل وتركيب الخلية المصبوغة ، لذا يجب أن تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة ، ويعرف ذلك إذا وضعت الشريحة على ظهر اليد .

(*) إنه من المفترض أن تكون الشريحة نظيفة ، وإحدى طرق تنظيف الشريحة يتم بواسطة :
(أ) ضع قطرة من الزيلول على سطح الشريحة .
(ب) نظف بقطعة قماش .
(جـ) مرر سطح الشريحة المنظف فى لهب بنزن Bunsen عدة مرات للتعقيم الجزئى ولإزالة ما يكون عالقا بها من حبيبات دهن ، ثم اتركها على حاملها لتبرد .

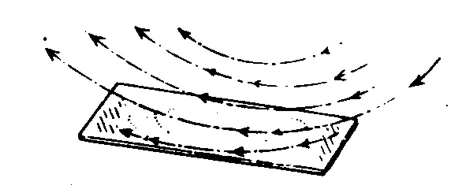
(١) ضع غمسة إبرة من المزرعة على سطح شريحة نظيفة



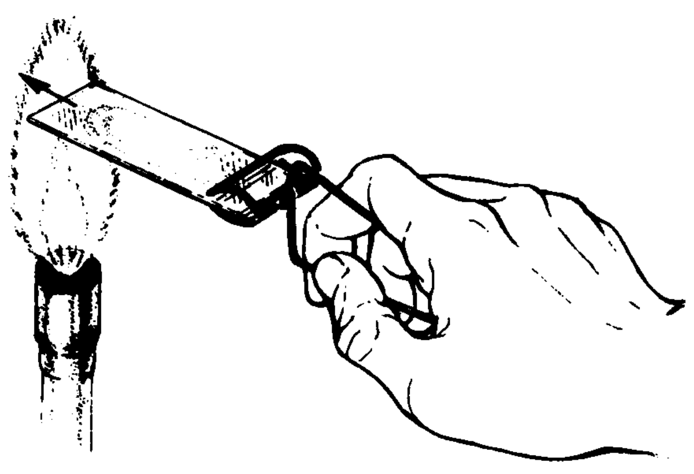
(٢) انشر لتكون غشاء رقيقا على سطح الشريحة .



(٣) جفف بالهواء .



(٤) ثبت الغشاء بتمرير الشريحة بسرعة فى لهب بنزن ثلاث مرات .



شكل (١) : تحضير غشاء للصبغ .

والغرض من عملية تثبيت الغشاء هو قتل الكائنات الدقيقة وتجميع بروتوبلازم الخلية ولصق الغشاء بسطح الشريحة كما ذكر سابقا .

والتثبيت النموذجى هو الذى يحفظ تركيبات الخلية فى شكلها ووضعها الطبيعى ، دون حدوث تشوهات ، أو ظهور تركيبات لم تكن موجودة بالخلية الحية . وبينما يعتبر التسخين الهين أنسب

الطرق استعمالا لعملية تثبيت الغشاء ، فإن مواد أخرى مثل : الكحول وبعض الكيميائيات قد تستعمل أيضا .

انظر شكل (١) الذى يوضح كيف تحضر غشاءً للصبغ .

الصبغ بالصبغات القاعدية Staining With Basic Dyes

قد تستعمل لصبغ البكتيريا الصبغات القاعدية مثل : صبغات أزرق الميثلين Methylene blue ، الكريستال البنفسجى Crystal violet ، وكربول الفوكسين Carbol fuchsin ، ورغم أن كل هذه الصبغات قاعدية ، إلا أنها تختلف عن بعضها فى مدى درجة صبغها للخلية . فأزرق الميثلين أكثر بطأ فى تفاعله مع الخلية السالبة الشحنة ، حيث يحتاج من ٣٠ - ٦٠ ثانية لصبغ الغشاء الميكروبى ، بينما الكريستال البنفسجى أكثر فاعلية ، ونشاطا ، ويحتاج عادة لحوالى ١٠ ثوان ، أما كربول الفوكسين فهو أسرعها وأقواها فى الصبغ ، ويحتاج إلى حوالى ٥ ثوانٍ .

وكربول الفوكسين عبارة عن : خليط من صبغة الفوكسين القاعدية ، والفينول . ونظرًا لأن كربول الفوكسين يمتاز بنشاطه الكبير فى التفاعل ، فقد يسبب بعض المتاعب الناتجة عن زيادة الصبغ over-staining ، خاصة فى التحضيرات التى تحتوى على كميات كبيرة من المواد العضوية ، والمخلفات debris .

١ - ضع الشريحة التى عليها الغشاء المثبت - الذى سبق تحضيره فى بداية هذا التمرين - على شبكة سلكية للصبغ بأسفلها حوض .

٢ - اغمر الغشاء بحوالى ٥ نقط من الصبغة المطلوبة ، واتركها وقتا كافيًا للتفاعل : ٣٠ ثانية لأزرق الميثلين ، ١٠ ثوان للكريستال البنفسجى ، ٥ ثوان لكربول الفوكسين .

٣ - اغسل الغشاء المصبوغ بماء الحنفية الذى بدورق الغسيل ، وذلك لإزالة الصبغة الزائدة .

٤ - جفف الشريحة بوضعها بين ورقتى نشاف نظيف ثم أعلى اللهب .

٥ - افحص الغشاء المصبوغ بواسطة العدسة الزيتية . ارسم ما تشاهده .

إذا كان الغشاء المحضر سميكا ، فسيظهر الغشاء المصبوغ ككتل متجمعة من مادة مصبوغة مع قليل جدًّا من الخلايا الفردية .

لاحظ بدقة الفروق الموجودة فى حجم الخلايا ، وشكلها ، ونظام تجمعها .

فى حالة الغشاء المحضر من اللعاب ، فإنك ستشاهد خلايا متعددة مختلفة لأنواع عديدة من البكتيريا ، والفطر ، والخلايا الطلائية ، وكرات الدم البيضاء .

الشحنة السائدة على خلية البكتيريا (أو البروتين) هى نتيجة لتأثير حموضة الوسط الموجودة فيه . لذلك فإن خفض حموضة الوسط (أى زيادة الرقم الأيدروجينى) ، يزيد من مقدار الشحنة السالبة على الخلية مسببا قوة جذب أكبر للصبغات القاعدية ، والعكس صحيح بالنسبة للصبغات الحامضية . لذلك فإن الصبغ بالصبغات القاعدية يكون ضعيفا عند رقم أيدروجينى منخفض ، بينما يكون الصبغ ضعيفًا بالصبغات الحامضية عند رقم أيدروجينى مرتفع .

أســـئلة QUESTIONS

١ – هل يتشابه الميكروب المعزول من تحت سطح بيئة الآجار فى صفاته المزرعية ، والميكروسكوبية ، لأى من العزلات الأخرى ؟

٢ – هل تستطيع القول بأن كل عزلاتك كانت عبارة عن مزارع نقية ؟

تـدريـــب (٩)

الصبغ السالب ، أو غير المباشر Negative or Indirect Staining

يعتبر الإيوسين Eosin أحد أمثلة الصبغات الحامضية ، وهو يستعمل كصبغة فى صورة ملحه الذائب المسمى إيوسينات الصوديوم Sodium eosinate . عندما يتأين الملح يعطى أيونات صوديوم موجبة ، وأيونات إيوسينات سالبة ، وإلى هذه الأيونات السالبة تعود قدرة الملح على التلوين . ومن الأمثلة الأخرى للصبغات الحامضية مادة النيجروسين Nigrosine ، التى ستستعملها لصبغ بعض المزارع وصبغ جزء من المادة البيضاء المغطية للأسنان Teath tarter .

ماذا يحدث عند صبغ الغشاء الميكروبى بالصبغة الحامضية ؟ حيث إن قدرة الصبغة على التلوين تعود إلى الأيون السالب والذى لن يتحد مع أيون آخر سالب ، فإن الصبغة الحامضية لا تصبغ خلايا البكتيريا السالبة الشحنة ، وبديلا عن دلك ، فإن الصبغة الحامضية تكوّن راسبا حول الخلية . وبذلك فإن الخلايا لا تصبغ ويظهر الميكروب شفافا غير مصبوغ والذي يُصبغ هو الشريحة التى تظهر ملونة – لذلك فإن هذا النوع من الصبغ يسمى بالصبغ السالب Negative staining ، أو بالصبغ غير المباشر Indirect staining (انظر شكل (١)) .

رغم أن هذه الطريقة من الصبغ ، غير شائعة الاستعمال فى الأعمال البكتريولوجية ، إلا أن لها فائدة واحدة عن الصبغ المباشر ؛ فالصبغ غير المباشر يعطى صورة أكثر وضوحا ودقة للخلية البكتيرية من حيث حجمها وشكلها .

(١) امزج ٢ غمسة إبرة ، من المزرعة المطلوب صبغها ، بقطرة من النيجروسين .

(٢) بواسطة إبرة التلقيح أو شريحة زجاجية ، انشر الصبغة على سطح الشريحة .

(٣) جفف بالهواء

كيف ستظهر الصبغةتحت الميكرسكوب



الوسط المحيط عديم اللون
تقريبا ، لا يوجد تباين

غشاء رقيق جدا

شكل (١) : الصبغة السالبة (غير المباشرة) .

طريقة العمل PROCEDURE

انقل عدد ٢ غمسة إبرة من المعلق البكتيرى من كل مزرعة معزولة فى تدريب ٧ إلى سطح الشريحة ، ثم أضف قطرة صغيرة من محلول النيجروسين . امزج جيدًا بالإبرة وانشر المزيج بواسطة حافة شريحة زجاجية لتكوين غشاء رقيق كما هو موضح فى شكل (١) .

انشر الصبغة بطريقة تجعلها متدرجة فى السمك على الشريحة من سميك نسبيا إلى رقيق . فطبقة الصبغة السميكة جدًا لن تسمح لضوء الميكرسكوب بالنفاذ كما أن الصبغة ستتشقق عند التجفيف . أما إذا كان الغشاء رقيقا جدًا ، فإن التباين بين خلايا البكتيريا والوسط المحيط سيصبح قليلا جدا وغير كاف . لذلك فإنه بتدريج سمك الصبغة ، فإنك ستحصل فى مساحة ما من الشريحة على سمك مناسب من الغشاء للفحص :

لتحصل على المادة البيضاء الجيرية المغطية للأسنان ولفحصها ، حك سطح أسنانك والفجوات التى بينها بسلاكة أسنان Teeth pick ، ثم اخلط المادة البيضاء مع نقطة ماء على سطح الشريحة ، واصبغ بالنيجروسين .

٢ - جفف بالهواء ، ولاتثبت بالحرارة .

٣ - افحص بالزيتية وارسم ما تراه على ورق التقرير الخاص .

تذكر أن الخلايا ستظهر غير ملونة ، بينما ستظهر المساحة المحيطة بالخلايا زرقاء معتمة .

أسـئلة QUESTIONS

١ - لماذا لا يثبَّت الغشاء بالحرارة قبل الصبغ بالنيجروسين ؟

٢ - إذا ما استعمل الصبغ غير المباشر بالنيجروسين لقياس حجم الخلايا ، ما هى نواحى القصور الخاصة بهذه الطريقة التى تحول دون الوصول إلى المقاييس الحقيقية لحجم الخلية ؟

٣ - ما هى طريقة الصبغ الشائعة الاستعمال لقياس حجم الخلايا ؟ وما هى نواحى القصور بها ؟

طرق الصبغ المركب (التفريقى)

DIFFERENTIAL STAINING TECHNIQUES

يعتمد الصبغ البسيط على حقيقة أن خلايا البكتيريا تختلف كيميائيًّا عن الوسط المحيط بها ، لذلك فإنها تصبغ لإظهار التباين بينها وبين الوسط . ومن ناحية أخرى .. تختلف الكائنات أيضا فيما بينها

كيميائيا وفيزيائيًا ، ولذلك فإنها تتفاعل بدرجات مختلفة بالنسبة لطريقة صبغ معينة . وهذا هو الأساس الذى يعتمد عليه الصبغ التفريقى ، ومن هنا فإنه يمكن تعريف الصبغ التفريقى Differential staining بأنه طريقة للتمييز ، والتفرقة بين أنواع البكتيريا .

تدريـــب (١٠)

صبغـــة جـــرام Gram Stain

صبغة جرام صبغة تفريقية ، وتعتبر من أهم طرق الصبغ استعمالا فى البكتريولوجى . فباستعمال هذه الطريقة ، يمكن تقسيم البكتيريا إلى مجموعتين : موجبة لجرام gram-positive ، وسالبة لجرام gram-negative . ويُعتقد أن سبب الاختلافات فى الصبغ بين هذين النوعين من الخلايا ، يعود إلى الاختلافات الموجودة فى طبيعة ، وتركيب الطبقات السطحية ، أو جدر هذه الخلايا . عمومًا .. فإن الخلايا الموجبة ، أو السالبة لجرام تميل إلى التفاعل بدرجات مختلفة مع كثير من العوامل الفيزيائية ، والكيميائية . وتحتاج صبغة جرام لأربعة محاليل مختلفة :

(أ) صبغة قاعدية Basic dye (الصبغة الأساسية) .

(ب) مرسخ Mordant

(جـ) عامل مزيل للون Decolorizing agent

(د) صبغة مضادة Counterstain (الصبغة الثانية)

بالنسبة للصبغة القاعدية فقد سبق شرحها . أما المرسخ فهو : عبارة عن مادة تزيد القابلية affinity ، أو الجذب attraction بين الخلية ، والصبغة ، بمعنى أنها تساعد على ترسيب الصبغة وتثبيتها على سطح الخلية بطريقة ما . من أمثلة المرسخات : الأحماض ، القواعد ، أملاح المعادن ، واليود . وباستعمال المادة المرسخة فإن الخلية تصبغ بقوة كما أنه يصعب إزالة الصبغة منها .

العامل المزيل للون ، كما يبدو من اسمه ، عبارة عن مادة تزيل الصبغة من الخلية المصبوغة . بعض الخلايا المصبوغة تزول صبغتها بسهولة أكثر عن خلايا أخرى . وفى صبغة جرام وبعض الصبغات التفريقية الأخرى ، فإن التفرقة بين أنواع البكتيريا تعود إلى الاختلافات فى سرعة إزالة الصبغة بين تلك الأنواع .

الصبغة المضادة هى : صبغة قاعدية تختلف فى لونها عن لون الصبغة الأساسية المستعملة ، والغرض من استعمال الصبغة المضادة هو إعطاء الخلايا التى أزيلت منها الصبغة الأساسية ، لونا يختلف عن لون الصبغة الأساسية . وعلى ذلك .. فإن الخلايا التى لم تزل منها الصبغة الأساسية ،

تحتفظ بلون الصبغة الأساسية ، أما الخلايا التى أزيلت منها الصبغة الأساسية فإنها تأخذ لون الصبغة المضادة .

دعنا الآن نلخص طريقة الصبغ بصبغة جرام . تتضمن الخطوة الأولى صبغ الخلايا بغزارة بالصبغة القاعدية الأساسية – يتبع ذلك معاملة تلك الخلايا المصبوعة بمرسخ مثل : اليود – بعد ذلك تعامل الخلايا بعامل مزيل للون مثل : الكحول . الخلايا التى ستحتفظ بالصبغة الأساسية – عقب استعمال مزيل اللون – تسمى موجبة لجرام ، أما الخلايا التى زالت منها الصبغة الأساسية فتسمى سالبة لجرام ، وهذه يمكن إعادة صبغها بصبغة مضادة ذات لون مختلف – (انظر شكل (١)) .

طريقة العمل PROCEDURE

تستعمل مزارع حديثة العمر Young cultures عمرها ١٨ – ٢٤ ساعة ، لأن مثل هذه المزارع مازالت تحتفظ بخواص تراكيب جدار الخلية . أما المزارع القديمة المسنة old cultures فإنها تميل إلى فقد خاصية الصبغ الموجب لجرام .

١ – جهز أغشية من كل من *Bacillus cereus; Streptococcus faecalis* وغشاء واحد خليط من *Escherichia coli; Micrococcus luteus* . ثبت الأغشية بالحرارة .

٢ – اصبغ بالكريستال البنفسجى لمدة ٣٠ ثانية .

٣ – اغسل بالماء .

٤ – غط الغشاء بمحلول اليود Gram's iodine واتركه لمدة ٣٠ ثانية للتفاعل .

٥ – اغسل بالماء .

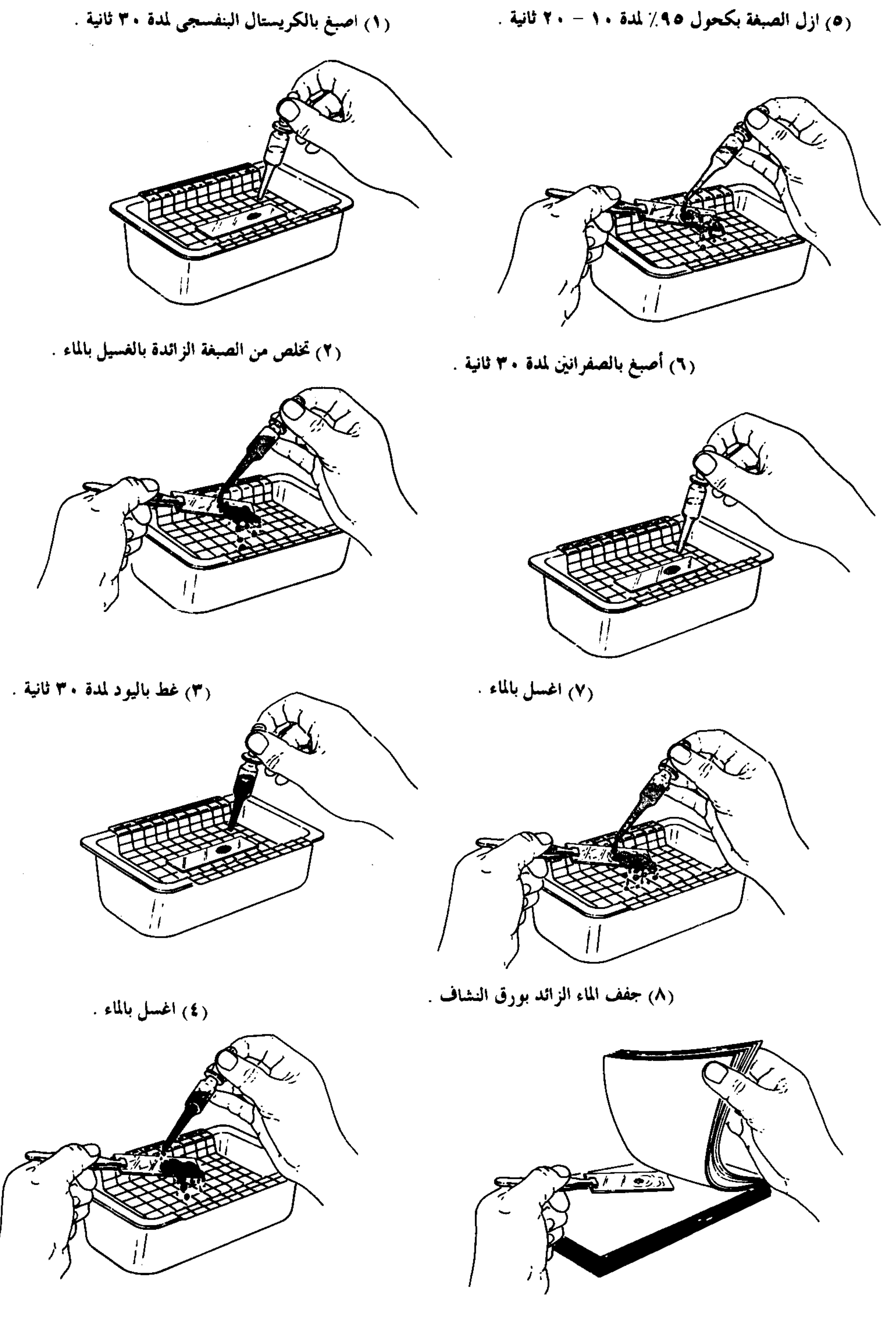
٦ – ضف كحول ٩٥٪ لإزالة اللون ، الغشاء الرقيق يكفيه من ١٠ – ٢٠ ثانية . ويمكن أيضا أن يضاف الكحول على الغشاء نقطة نقطة مع إمالة الشريحة للأمام ، والخلف حتى يصير الكحول المتساقط من الشريحة عديم اللون .

٧ – اغسل بالماء .

٨ – اصبغ بالصبغة المضادة وهى الصفرانين لمدة ٢٠ – ٣٠ ثانية ، ثم جفف الشريحة بورق النشاف ثم أعلى اللهب .

٩ – افحص بالعدسة الزيتية ، ثم ارسم ما تشاهده .

ماذا يحدث فى كل خطوة من خطوات الصبغ بهذه الطريقة ؟ إذا فحصت الخلايا الموجبة ، والسالبة لجرام عقب كل خطوة ، ستلاحظ النتائج المدونة فى جدول (١) .



شكل (١) : طريقة الصبغ بجرام (حقوق الطبع محفوظة ، فريمان وشركاه ، ١٩٦٤) .

جدول (١) : خطوات الصبغ بجرام .

خطوات الصبغ	الطـريقـــة	النتيجـــة	
		جرام موجب	جرام سالب
الصبغة الأساسية	كريستال بنفسجى لمدة ٣٠ ثانية	لون بنفسجى	لون بنفسجى
المرسخ	محلول اليود لمدة ٣٠ ثانية	يستمر اللون بنفسجى	يستمر اللون بنفسجى
إزالة لون الصبغة	كحول ٩٥٪ لمدة ١٠ - ٢٠ ثانية	يستمر اللون بنفسجى	غير ملون
الصبغة المضادة	صفرانين لمدة ٢٠ - ٣٠ ثانية	يستمر اللون بنفسجى	لون وردى

تفرق صبغة جرام البكتيريا إلى مجموعتين مختلفتين على أساس الفروق الموجودة فى طبيعة جدارها الخلوى . فبينما نجد أن الجدار الموجب لجرام فى أغلب البكتيريا يتكون أساسا من طبقة سميكة من البيتيدوجلوكان Peptidoglycan ، نجد أن الجدار السالب لجرام يتركب من عدة طبقات Multilayered ، عبارة عن : طبقة رقيقة من الببتيدوجلوكان محاطة بطبقات خارجية من البروتين ، والليبيدات ، وعديدة السكريات . والاختلاف بين نوعى البكتيريا فى درجة نفاذية هذه التركيبات السطحية للمحاليل المستعملة فى صبغة جرام ، يسبب التفرقة فى الصبغ .

وللشرح المفصل الخاص بطبيعة وتفاعل الصبغ بجرام ، عليك أن تعود إلى مراجع الميكروبيولوجى الخاصة بعلم الخلية الميكروبى .

عرض جانبى مجهز Demonstration

افحص العرض الخاص بتأثير الاختلافات فى طرق الصبغ على نتيجة الصبغ بجرام .

أســـئلة QUESTIONS

١ - هل تستطيع أن تستخدم صبغات أخرى مكان الصبغة الأساسية ، والصبغة المضادة ؟

٢ - ماهو تأثير استخدام عوامل أخرى مؤكسدة بدلا من اليود ؟

٣ - ما مدى كفاءة الكحولات الأخرى بخلاف الإيثانول كعوامل مزيلة للون ؟

٤ - ما هو تأثير الرقم الأيدروجينى على نتيجة تفاعل صبغة جرام ؟

تدريـــب (١١)

الصبغة الصامدة للأحماض Acid-Fast Stain

الصبغة الصامدة للأحماض صبغة تفريقية ، تقيس مقاومة الخلية المصبوغة لإزالة لون الصبغة بالأحماض . وخاصية الصبغ الصامد للأحماض Acid-Fastness فى بعض خلايا الميكوبكتيريا والأكتينوميسيتات ترتبط بمحتوى تلك الخلايا العالى من الليبيدات . وصبغ هذه الخلايا صعب بالطرق العادية ، لذلك فإن صبغها يحتاج إلى تسخين مع استعمال صبغات ذات قابلية كبيرة لهذه الخلايا . وبمجرد صبغ هذه الخلايا ، فإن الصبغة تثبت فيها وتتعذر إزالتها حتى باستعمال كحول مضاف إليه حامض ، وبسبب هذه الخاصية أطلق على طريقة الصبغ هذه اسم الصبغ الصامد (المقاوم) للأحماض .

وتتضمن الطريقة الصبغ بكاربول الفوكسين الساخن ، ثم محاولة إزالة اللون بمحلول من الكحول الحامضى ، ثم الصبغ المضاد للخلايا . يزول اللون من البكتيريا الصامدة للأحماض ببطء شديد بالكحول الحامضى عن الخلايا الأخرى ، ولهذا تحتفظ بلون الصبغة الأساسية بعد الصبغ بالصبغة المضادة .

تستعمل هذه الطريقة من الصبغ أساسا فى تشخيص ودراسة بعض الأمراض - مثل : السل Tuberculosis ، والجزام Leprasy - التى تسببها أنواع من البكتيريا الصامدة للأحماض . كما أن هذه الصبغة تستعمل كصبغة تفريقية لعدد كبير من البكتيريا غير الضارة المترممة الصامدة للأحماض .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - اعمل غشاء يتكون من خليط من ميكروبى Mycobacterium, Escherichia coli .

٢ - جفف الغشاء بالهواء ثم ثبت بالحرارة .

٣ - غط الغشاء بكاربول الفوكسين . ضع الشريحة أعلى اللهب حتى يبدأ البخار فى التصاعد ثم أزحها إلى أن يقف تصاعد البخار . كرر التسخين ، والإزاحة لمدة ٥ دقائق . يجب ألا تترك الصبغة تغلى ، أو تجف ، وعند ملاحظة ذلك تضاف صبغة جديدة .

٤ - صب الصبغة الزائدة فى الحوض .

٥ - اغسل بالماء .

٦ - ازل اللون بالغسيل بالكحول الحامضى (٩٠٪ كحول إيثانول يحتوى ٢,٥٪ حامض نتريك) لمدة ١٠ - ٣٠ ثانية ، أى إلى أن يصبح لون الغشاء أحمر فاتحاً Faint pink .

٧ – اغسل بالماء لإزالة آثار الحامض المتبقية .

٨ – اصبغ بالصبغة المضادة أزرق المثيلين لمدة ٣٠ ثانية بدون تسخين .

٩ – اغسل بالماء ثم جفف الشريحة بورق النشاف ثم أعلى اللهب .

١٠ – افحص بالعدسة الزيتية ثم ارسم ما تشاهده .

عرض جانبي مجهز Demonstration

افحص عرض الصبغ الصامد الذى استعملت فيه صبغات بديلة للصبغة الأساسية ، والصبغة المضادة ، والذى استبعدت منه خطوة التسخين .

باستعمال طريقة الصبغ الصامد للأحماض ، اصبغ بصاقاً به ميكروب السل (سبق تعقيمه بالأوتوكلاف) . حضر الغشاء بتفتيت البصاق ثم نشره كغشاء رقيق بين شريحتين .

بعد الصبغ افحص لوجود البكتيريا الصامدة للأحماض ، ولاحظ كيف أنها تختلف فى مظهرها عن الكائنات الأخرى التى بالبصاق .

لايزول لون البكتيريا الصامدة للأحماض بالكحول الحامضى وستظهر باللون الأحمر . أما الخلايا الأخرى ستظهر باللون الأزرق . .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هو تأثير استعمال صبغات أخرى كبدائل للصبغة الأساسية والصبغة المضادة ؟ وما هو تأثير عدم التسخين ؟

٢ – هل الكائنات الصامدة للأحماض موجبة ، أم سالبة لصبغة جرام ؟

تـدريـــب (١٢)

صبغات فحص تركيبات الخلية Structural Stains

تستعمل طرق صبغ خاصة وذلك لتوفير التباين المطلوب ، لرؤية التركيبات المختلفة بخلية البكتيريا بواسطة الميكروسكوب الضوئى . ويوضح التدريب التالى بعض الصبغات المستعملة فى فحص تركيبات الخلية .

PROCEDURE
الطريقة

Endospore Stain
صبغة الجراثيم الداخلية

تكوّن أنواع البكتيريا التابعة لجنس *Bacillus* وجنس *Clostridium* تركيبا خاصا يسمى بالجرثومة الداخلية Endospore . والجرثومة الداخلية ، على عكس الخلية الخضرية التى تكونها ، عبارة عن جسم شديد المقاومة ، لها القدرة على البقاء حية لمدة طويلة حتى تحت ظروف غير مناسبة من الحرارة المرتفعة والكيميائيات السامة . والجرثومة الداخلية تقاوم عملية الصبغ ، ولكن بمجرد أن تصبغ فإنها تقاوم بشدة عملية إزالة الصبغة منها ، أو الصبغ بالصبغة المضادة . وتستخدم هذه الخاصية بطريقة الصبغ الموضحة هنا ، وذلك لفحص الجراثيم الداخلية بواسطة الميكروسكوب (انظر شكل (١) الذى يوضح خطوات الصبغ بطريقة شيفر و فلتون بنظام آخر غير الموضح فيما بعد) .

فى طريقة شيفر و فلتون Schaeffer and Fulton تستعمل صبغة أخضر المالاكيت Malachite green الساخنة التى لاتزول بالغسيل من الجروثومة وذلك كصبغة أساسية ، وتستعمل صبغة الصفرانين كصبغة مضادة . وعلى ذلك فإن الجرثومة تُصبغ باللون الأخضر بينما تصبغ باقى الخلية (أو الخلية التى بدون جرثومة) باللون الأحمر الخفيف .

١ – حضر غشاء من مزرعة *Bacillus cereus* ، أو من مزرعة *C. sporogenes* . جفف ثم ثبت الغشاء بالحرارة .

٢ – اغمر الغشاء بأخضر المالاكيت (٥٪ محلول مائى) .

٣ – سخن الشريحة أعلى اللهب إلى أن يبدأ البخار فى التصاعد ، استمر لمدة ٥ دقائق (بنفس الطريقة المتبعة فى الصبغة الصامدة للأحماض تدريب (١١) .

٤ – صب الصبغة الزائدة بالحوض ثم اغسل الغشاء بالماء برفق .

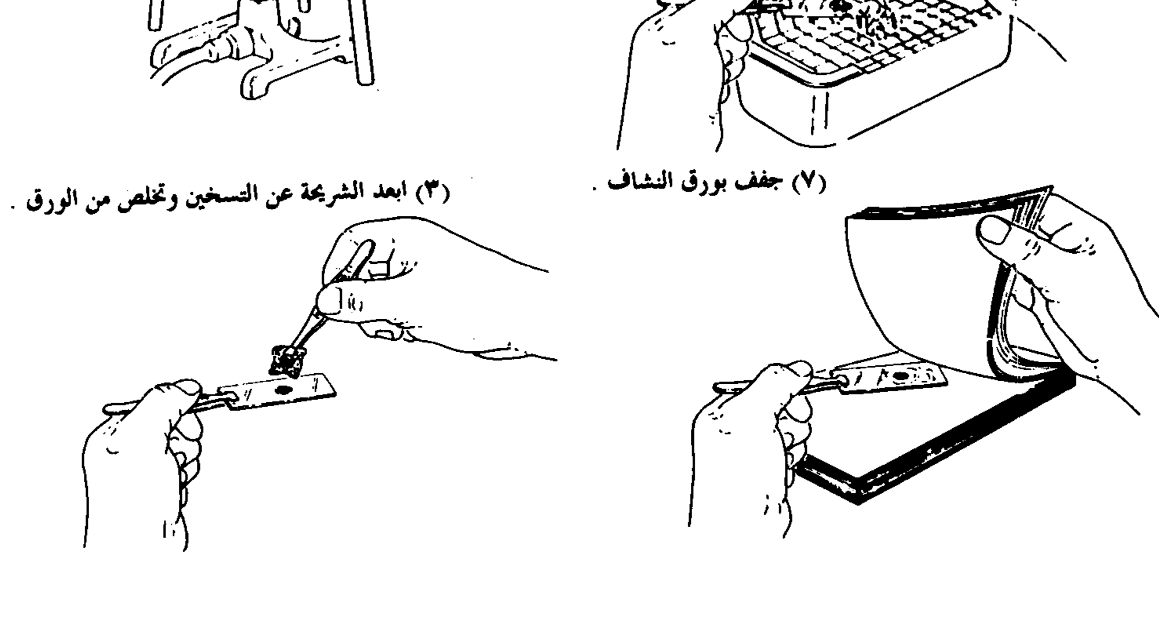
٥ – غط الغشاء بمحلول الصفرانين لمدة ٣٠ ثانية .

٦ – اغسل بالماء ، جفف بورق النشاف ثم أعلى اللهب . افحص بالزيتية ثم إرسم ما تشاهده .

يمكن استخدام الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى لفحص الجرثومة الداخلية بدون صبغ ، حيث تظهر الجرثومة كجسم أبيض كثيف بالخلية . (انظر شكل ٢) .

إذا ما توافر لديك الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى ، افحص الجرثومة الداخلية لخلايا غير مصبوغة من مزارع *B. cereus & C. sporogenes* .





شكل (١) : خطوات صبغ الجرثومة الداخلية .



شكل (٢) : صورة بالميكروسكوب الأليكترونى لجرثومة داخلية ببكتيريا *Bacillus cereus* (من تشابمان ، مجلة البكتريولوجى : J. Bact. 71, 348, 1956) .

صبغة جدار الخلية Cell-Wall Stain

إن جدار خلية البكتيريا الحقيقية صلب rigid ، ونظرًا لقلة سمكه ، ومقاومته للصبغ ، فإنه من الصعب تمييزه عن باقى الخلية . ومع ذلك ، فإنه باستعمال بعض المرسخات ، يمكن صبغه ، ومشاهدته (انظر شكل ٣) . على سبيل المثال .. فإنه يمكن شحن جدار الخلية بشحنة موجبة



شكل (٣) : صورة بالميكروسكوب الإليكترونى توضح جدار الخلية فى *Streptococcus* (إهداء من د . جوزيف براون) .

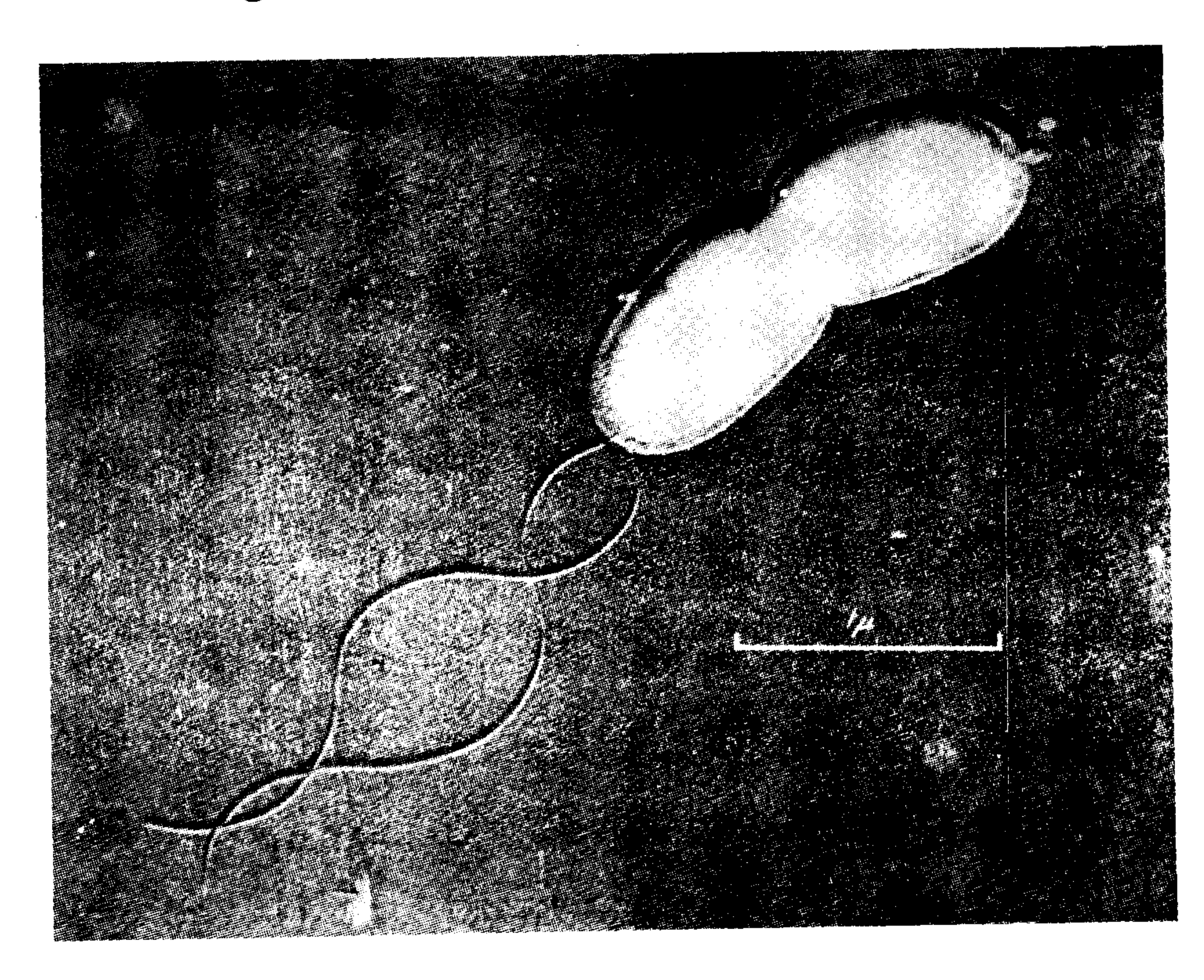
بمعاملته بعامل سطحى كاتيونى فيمكن عقب ذلك صبغ جدار الخلية بصبغة حامضية . فى نفس الوقت فإن السيتوبلازم يحتفظ بشحنته السالبة ويمكن صبغه بصبغة قاعدية لزيادة التباين .

افحص العرض المجهز الخاص بصبغة جدار الخلية باستعمال العدسة الزيتية ، لاحظ أن الضبط الدقيق للإضاءة ضرورى لإتمام الفحص .

فى هذا العرض .. شُحن جدار الخلية بشحنة موجبة باستعمال Cetyl pyridinium chloride ، الذى يتأين فى الماء ليكون كاتيونًا Cetyl pyridinium موجب الشحنة ، وأيون الكلوريد سالب الشحنة ، ونتيجة لادمصاص Cetyl pyridinium chloride ، فإن سطح خلية البكتيريا (أو الجدار) سيصبح موجب الشحنة ، وبالصبغ .. فإن الجدار سيصبغ باللون الأحمر باستعمال الصبغة الحامضية أحمر كونغو Congo red ، بينما سيأخذ السيتوبلازم اللون الأزرق من الصبغة المضادة أزرق الميثلين .

صبغة الفلاجلات (الأسواط) Flagella Stain

الفلاجلات هى أعضاء الحركة للبكتيريا الحقيقية . والفلاجلا الواحدة رفيعة جدًّا فقطرها أقل من حدود القدرة التوضيحية للميكروسكوب الضوئى . لذلك كان الفحص المباشر للفلاجلات مستحيلا قبل اكتشاف الميكروسكوب الإليكترونى (انظر شكل ٤) . ومع ذلك ، فهناك طرق



شكل (٤) : صورة بالميكروسكوب الإليكترونى توضح الفلاجلات (إهداء من الجمعية الأمريكية للميكروبيولوجى) .

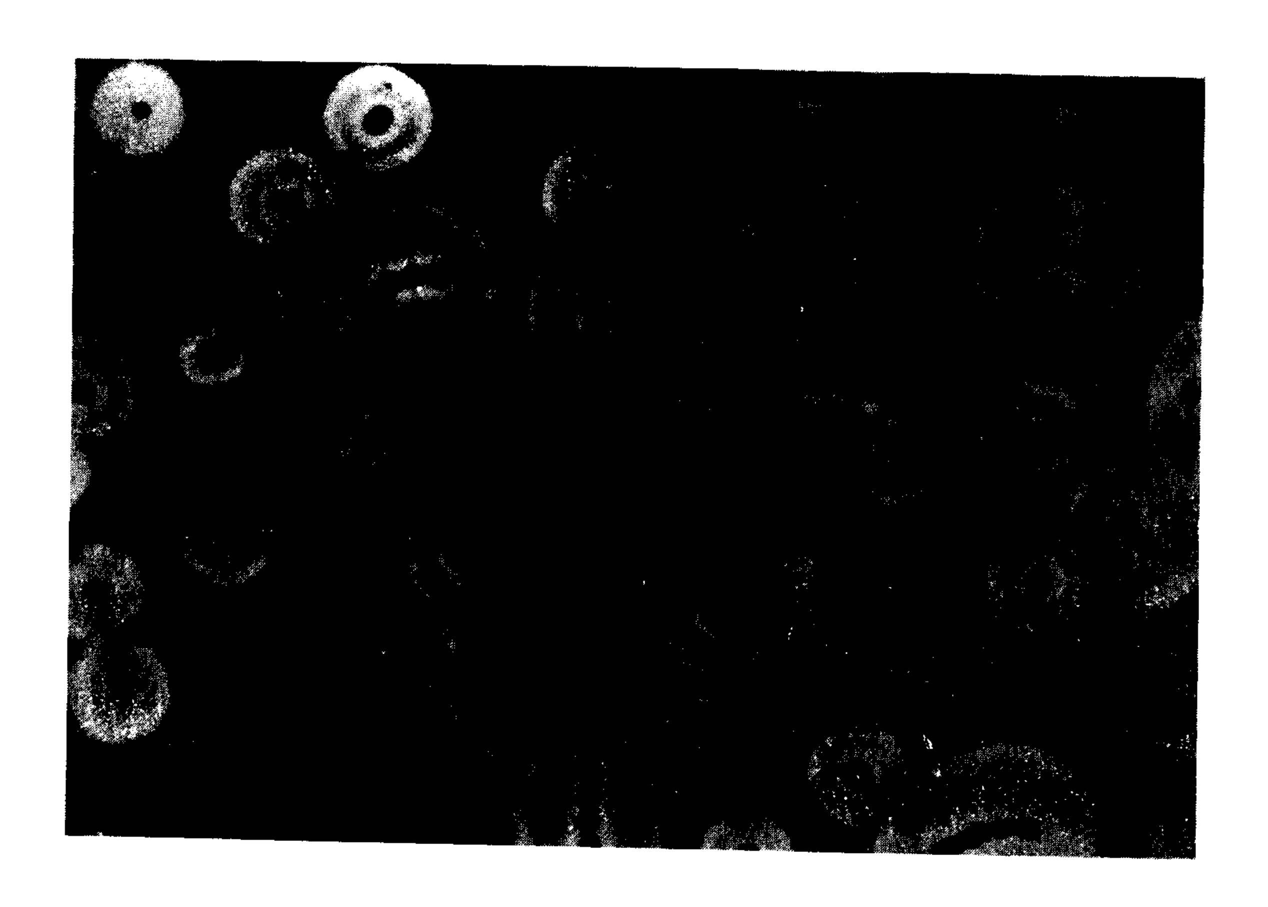
خاصة من الصبغ ، تستعمل فيها المرسخات التى تغطى سطح الفلاجلات فتزيد من سمكها ، وتصبح فى حدود القدرة التوضيحية للميكروسكوب الضوئى .

افحص العرض المجهز الخاص بالتوزيعات المختلفة للفلاجلات فى الخلايا البكتيرية باستعمال الميكروسكوب الضوئى .

صبغة الكابسول (العلبة) Capsule Stain

تغلف أنواع كثيرة من البكتيريا بطبقة صمغية تختلف فى سمكها من نوع لآخر ، تسمى الكابسول (العلبة) Capsule . وهى تصبغ بدرجة أقل من باقى الخلية . ونظرًا لأن الكابسول غالبا ما تظهر كمنطقة غير مصبوغة تحيط بالخلية المصبوغة ، فقد يحدث التباس بينها وبين تركيبات غير حقيقية artifacts غير مصبوغة مثل المناطق الخالية الناتجة من انكماش الخلية . واكفأ صبغات الكابسول هى تلك التى تميز الكابسول عن الخلية ، والوسط المحيط بها (انظر شكل ٥) .

افحص العرض المجهز الخاص بصبغة الكابسول باستعمال العدسة الزيتية .



شكل (٥) : صبغة الكابسول تحت الميكروسكوب الضوئى (من تايلور وجونى :J. Bact. 81, 698, 1961) .

QUESTIONS أســـئلة

١ – هل تستطيع أن تلاحظ الاختلافات بين الجراثيم الداخلية لكل من *B.cereus & C. sporogenes* من حيث الموقع ، والحجم ، والشكل ؟

٢ – كيف تظهر خلايا *B. cereus* المحتويه على جراثيم (طور الاسبورانجيوم) عند صبغها بصبغة جرام ؟

٣ – ما أهمية جدار الخلية بالنسبة للخلية ؟

٤ – كيف تختلف جدر خلايا البكتيريا عن جدر خلايا النبات ؟

٥ – لماذا لا تصبغ الخلية كلها باللون الأحمر عند استعمال صبغة جدار الخلية ؟

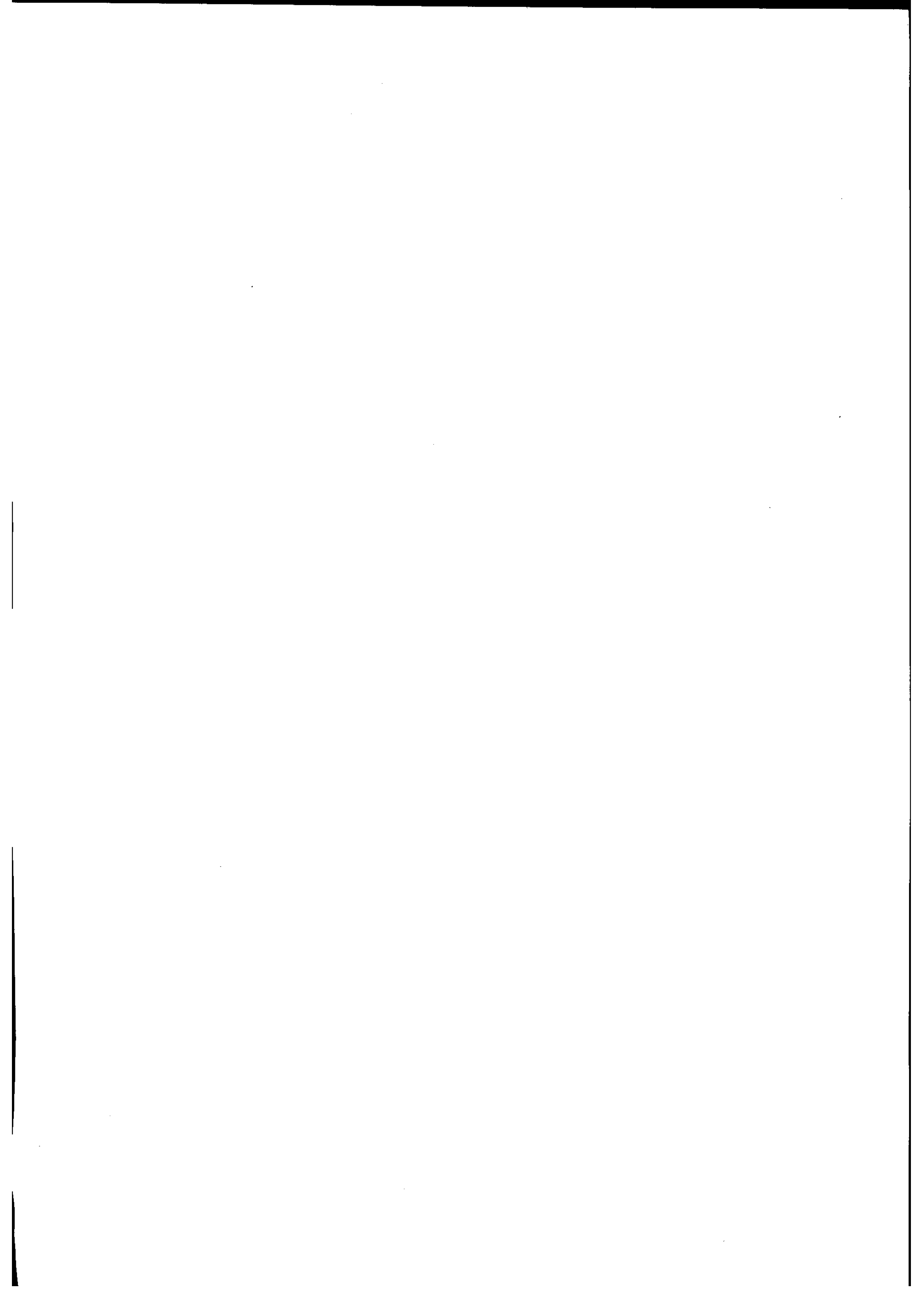
٦ – من أين تنشأ الفلاجلات بالخلية ؟

٧ – ما هى المرسخات التى تستعمل لصبغ الفلاجلات ؟

٨ – لماذا لا تستطيع استعمال طريقة صبغ الفلاجلات لعد الفلاجلات ؟

٩ – ما الدور الذى تلعبه الكابسول لصالح الخلية ؟

١٠ – ما أهمية الكابسول فى النواحى المرضية وفى الصناعات الغذائية ؟



الباب الرابع

تحضير البيئات ، وطرق التعقيم

THE PREPARATION OF MEDIA AND METHODS OF STERILIZATION

البيئات MEDIA

تستعمل فى الميكروبيولوجى أنواع كثيرة من البيئات ، تختلف كثيرا حسب الاحتياجات الخاصة بالميكروبات موضع الدراسة . وقد تصنف أحيانا البيئات إلى : بيئات مركبة غير محددة التركيب ، وبيئات معروفة التركيب .

البيئات المركبة Complex media غير المحددة التركيب ، وهى التى تحتوى على مايلزم لنمو الميكروبات من مواد بشكلها الخام crude form ، بمعنى أن جميع مكونات البيئة ، وكمياتها غير معروفة بالضبط . وكثير من مكونات البيئة المركبة عبارة عن : نواتج تحلل إنزيمى ، أو حمضى لأنسجة نباتية مختلفة ، لحوم ، كازين ، وخلايا خميرة ، التى توفر حسب نوع المادة مصادر غنية من ببتيدات عديدة ، الأحماض الأمينية ، والفيتامينات ، أو المعادن . ومن الأمثلة المحددة لبعض مكونات البيئة المركبة : الببتونات ، والتربتوفان – التى تعتبر نواتج تحلل مائى ، بالإنزيمات للبروتين الحيوانى – وكذلك مستخلص الخميرة الغنى فى فيتامين « ب » المركب . وعادة ما يوجد بعض الكربوهيدرات فى هذه المواد الخام ، ورغم ذلك فإن الكثير من البيئات المركبة تزود بسكر إضافى فى صورة جلوكوز .

أما البيئات المعروفة التركيب أى المحددة Defined media ، فهى تحتوى على المواد اللازمة للنمو فى صورة كيميائيات نقية تقريبا وبتركيزات معروفة . وتختلف المواد المكونة للبيئة كثيرا حسب الاحتياجات الغذائية للنوع الميكروبى المعين . فالمكونات الأساسية لبيئة خاصة بنمو بكتيريا غير ذاتية التغذية Heterotrophs غير معقدة الاحتياجات مثل *Escherichia coli* هى : أملاح معدنية ومصادر كربونية ونيتروجينية . وعلى هذا فإن البيئة المناسبة المحددة التركيب لبكتيريا *E-coli* تتكون من : جلوكوز ، $MgSO_4$, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, NH_4Cl ، أما العناصر الأساسية الأخرى مثل : الحديد ، والمنجنيز ، والنحاس ، فإنها عادة توجد بكميات كافية للنمو فى الكيميائيات المضافة ، كمواد

ملوثة – يعتبر الجلوكوز مصدر الكربون والطاقة ، ويستعمل كلوريد الأمونيوم كمصدر للنيتروجين .

أما البكتيريا غير ذاتية التغذية الأكثر تعقيدا فى التغذية من *E-coli* ، (وتسمى Fastidious) فإنها تفقد قدرات التمثيل الغذائى الموجودة فى *E-coli* ، لذلك قد تحتاج إلى أن يضاف لها بالبيئة : الفيتامينات المختلفة والأحماض الأمينية ، والبيورين ، والبريميدين .

يجب أن يضبط تأثير البيئة الغذائية للرقم الأيدروجينى المناسب للميكروب النامى ، ويتم ذلك عادة قبل تعقيم البيئة وإن كان فى بعض الحالات يجرى ضبط تأثير البيئة عقب التعقيم .

يتم تعقيم البيئة عادة بالحرارة فى جهاز الأوتوكلاف ، على درجة ١٢١° م لمدة ١٥ – ٣٠ دقيقة ، عند ضغط بخار ١٥ رطل على البوصة المربعة .

معنى الرقم الأيدروجينى — THE MEANING OF P^H

يتوقف عدد أيونات الأيدروجين (H^+) بالمحلول المائى على مدى تأين الأحماض الموجودة بالمحلول . والرقم الأيدرجينى p^H ، هو ناتج لوغاريتمى يحدد بالمعادلة .

$$pH = \log 1/(H^+) = -\log (H^+)$$

وعلى ذلك .. فإن الرقم الايدروجنى ٧ يعنى أن أيون الأيدروجين (H^+) يوجد فى المحلول بتركيز قدرة ١ × ١٠$^{-٧}$ ، وهذا الرقم هو تركيز أيون الأيدروجين للماء النقى عند ٢٥° م ، وهو يمثل حالة التعادل على تدريج الرقم الأيدروجينى .

وأى رقم أيدروجينى أكبر من ٧ ، يعنى أن المحلول أكثر قلوية (تركيز أيون الأيدروجين به أكثر انخفاضًا) عن الماء .

وأى رقم أقل من ٧ يعنى أن المحلول أكثر حموضة عن الماء . فمثلا .. ، فإن محلول HCl ٠,٠٠٠٠٠١ ع يحتوى اللتر منه على ١٠$^{-٦}$ مول من H^+ ؛ أى أنه له رقم أيدروجينى p^H = ٦

وحيث أن تدريج الرقم الأيدروجينى لوغاريتمى ، فإن تغير الرقم بوحدة واحدة ، يعنى تغير تركيز أيونات الأيدروجين بمقدار ١٠ مرات ، وعلى سبيل المثال .. فإن حامض HCl ٠,١ ع به ١٠$^{-١}$ (H^+) ان رقمه الأيدروجينى = p^H 1 ، بينما HCl ٠,٠١ ع به ١٠$^{-٢}$ (H^+) وله رقم أيدروجين = p^H ٢ .

وللحصول على النمو الأمثل للبكتيريا .. يجب أن يكون رقم p^H معظم البيئات الغذائية قريبًا من التعادل . ويلاحظ أن أغلب البيئات عند بداية تحضيرها تكون ذات تأثير حمضى ، لذلك فإنها تحتاج

لضبط قيمة الرقم الأيدروجيني ، ويقاس رقم البيئة الجارى تحضيرها إما بطرق لونية Colorimetrically ، أو بطرق فرق الجهد الكهربي Potentiometrically .

تقيس طرق فرق الجهد الكهربائية Potentiometric methods فرق الجهد بالفولت بين المحلول المختبر ، والمحلول القياسي – وتحوّل القراءة على مقياس الجهاز إلى وحدات الرقم الأيدروجيني pH .

فى الطرق اللونية Colorimetric methods .. تستعمل أدلة مختلفة indicators ، فى محاليل ، أو على ورق قياس الرقم الأيدروجيني تعطى لونا (للمحلول ، أو للورق) يعادل أرقام محددة من الـ pH . هذه الأدلة عبارة عن مركبات توجد فى المحلول كنظام يعطى ويستقبل البروتونات ، ولكل منها لون مختلف . ويمكن استعمال أدلة مختلفة لتغطية المدى الكامل من أرقام الأيدروجين كما هو موضح بجدول (٤ – ١) .

جدول (٤ – ١) : نطاق رقم الأس الأيدروجيني لبعض الأدلة .

اسم الدليل		اللون الحامضى	اللون القلوى	نطاق الرقم الأيدروجيني
ثايمول بلو	Thymol blue	أحمر	أصفر	١,٨ – ١,٢
بروم فينول بلو	Brom phenol blue	أصفر	أزرق	٤,٦ – ٣,٠
بروم كريزول جرين	Brom cresol green	أصفر	أزرق	٥,٤ – ٣,٨
مثيل رد	Methyl red	أحمر	أصفر	٦,٠ – ٤,٤
كلور فينول رد	Chlor phenol red	أصفر	أحمر	٦,٦ – ٦,٠
بروم كريزول بربل	Brom cresol purple	أصفر	بنفسجى	٧,٠ – ٥,٤
بروم ثايمول بلو	Brom thymol blue	أصفر	أزرق	٧,٦ – ٦,٠
فينول رد	Phenol red	أصفر	أحمر	٨,٤ – ٦,٨
ميتا كريزول بربل	Meta cresol purple	أصفر	بنفسجى	٩,٠ – ٧,٤
ثايمول بلو	Thymol blue	أصفر	أزرق	٩,٨ – ٨,٢
فينولفثالين	Phenolphthalein	عديم اللون	أحمر	٩,٦ – ٨,٠
كريزول فثالين	Cresolphthalein	عديم اللون	أحمر	٩,٨ – ٨,٢

ويمكن ضبط pH البيئة ، بأخذ جزء صغير من البيئة ومعايرته ، ومن كمية الحامض (أو القلوى) اللازمة لمعايرة هذا الجزء من البيئة ، يمكن حساب الكمية اللازمة لضبط كمية البيئة كلها .

أما بالنسبة للبيئات التى يتغير بها الرقم الأيدروجيني أثناء التسخين .. فإن ضبطه يجب أن يتم بعد التعقيم ، على أن يضاف الحامض المعقم (أو القلوى المعقم) للبيئة تحت شروط التعقيم .

تدريـــب (١٣)

تحضير البيئات المزرعية Preparation of Culture Media

أكثر البيئات المركبة (غير محددة التركيب) استعمالا لزراعة الكائنات الدقيقة ، هى بيئة البويون المغذى السائلة nutrient broth ، التى تحتوى على مستخلص اللحم beef extract والببتون . يحضر مستخلص اللحم بغلى اللحم الأحمر المفروم الطازج فى الماء ثم التبخير ليصبح عجينة . والمكونات الأساسية عبارة عن : نواتج تحلل البروتين ، وقواعد عضوية ، وفيتامينات ، وأملاح معدنية .

ويقوم كثير من الشركات المتخصصة فى توريد مستلزمات المعامل ، بإعداد البيئة السائلة ، المحتوية على ٠,٣٪ مستخلص لحم ، ٠,٥٪ ببتون ، وذلك فى صورة مجففة dehydrated ، حيث يمكن خلطها بالماء عند عمل البيئة السائلة ، كما يضاف لها الآجار بنسبة ١,٥ - ٢,٠٪ لتحضير البيئة الصلبة .

مثل هذه البيئات المجففة dehydrated media .. يكون الرقم الأيدروجينى بها مضبوط عادة عند ٧,٠ ؛ لذلك فإن إعادة ضبطه تصبح غير ضرورية .

فى هذا التدريب .. ستقوم بتحضير ، وتعقيم الآجار المغذى nutrient agar . وستُستعمل هذه البيئة لإعداد الأطباق التى ستستخدمها فى عمل أطباق مخطوطة ، كتدريب يبين مدى إتقانك لعملية الأطباق المخطوطة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - ضف ١٠٠ مل ماء مقطر إلى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ مل ، ثم ضف ٨, جرام من بيئة البويون المغذى المجففة . رج الدورق برفق أثناء إضافة الماء لإذابة المحتويات . يجب أن يكون المحلول النهائى رائق اللون .

٢ - بعد تمام إذابة مسحوق البيئة ضف ٢ جم آجار .

لاحظ أن الآجار لا يذوب إلا بالغلى عند درجة ١٠٠°م . يمكن توفير هذه العملية ، بتسخين المحلول للتعقيم وإذابة الآجار فى نفس الوقت .

٣ - عقم البيئة فى الأوتوكلاف (انظر تدريب ١٤) .

٤ - بعد التعقيم ، حرك دورق البيئة برفق - حركة دائرية - لتوزيع الآجار بانتظام بالبيئة ، ثم برد إلى ٤٥°م .

٥ – تحت شروط التعقيم ، صب البيئة فى أربعة أطباق بترى ، بمعدل ١٥ مل تقريبا بكل طبق .

إذا تكونت فقاقيع على سطح الآجار ، ارفع غطاء الطبق قليلا ، وباستعمال لهب بنزن مقلوب سخن سطح الآجار بسرعة باللهب لإزالة الفقاقيع .

٦ – حضن الأطباق ، والدورق ، بعد ترقيمها ، لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٠° م .

٧ – فى الدرس العملى التالى ، افحص لوجود أى تلوث ، واستبعد أى طبق ظهر به تلوث .

٨ – من المزرعة المقدمة لك ، خطط للأطباق الباقية لتكوين مستعمرات متباعدة منفصلة تماما عن بعضها .

٩ – اختر الطبق المناسب وضعه على الحامل . سيقوم مشرف الدرس العملى بتحضين الأطباق وتدريج الأطباق حسب جودة عملية التخطيط .

أســـئلة QUESTIONS

١ – ليس من الضرورى ضبط الرقم الأيدروجينى لبيئة البويون المغذى ، لماذا ؟ وإذا قمت بإعداد مستخلص اللحم من اللحم الأحمر ، هل يصبح من الضرورى ضبطه ؟ كيف تضبط الرقم الأيدروجينى لبيئة الآجار ؟

٢ – لماذا لا يمكن إنماء بعض أنواع من الكائنات الدقيقة على البيئة المعروفة التراكيب defined medium ؟

٣ – ما هى مميزات البيئات المركبة (غير المحددة التركيب) فى زراعة الكائنات الدقيقة بشكل عام ؟

تـدريـــب (١٤)

طرق التعقيم Sterilization Methods

تتضمن الطرق المعتادة فى التعقيم استعمال : الحرارة ، الترشيح ، الغاز ، الإشعاع .

بعض الأدوات مثل : الماصات ، وأطباق بترى تعقم بالحرارة الجافة dry-heat sterilization . وفى هذه الطريقة .. تعقم الأدوات بوضعها فى معقم الهواء الساخن hot-air sterilizer لمدة ساعة على درجة ١٧٠° م .

أما بالنسبة للمواد التى تتلف بالحرارة الجافة ، أو الرطبة عند درجات الحرارة العالية .. يستعمل

التعقيم المتقطع Intermittent sterilization, Tyndallization ، حيث تعقم المادة بتعريضها للبخار (١٠٠°م) لمدة ٣٠ دقيقة يوميا لمدة ثلاثة أيام متعاقبة ، مع ترك فترة قدرها ٢٤ ساعة بين كل تعقيمين – ونظرًا لطول وصعوبة هذه الطريقة ، فإنها لا تعتبر مناسبة لمعظم الأغراض .

بالنسبة لمعظم أنواع البيئات ، والملابس ، والكاوتش ، والمواد الأخرى التى تتلف بالحرارة الجافة .. يستعمل التعقيم بالبخار المضغوط steam-under-pressure sterilization باستخدام جهاز خاص يسمى الأوتوكلاف (المعقم بالبخار المضغوط) Autoclave . وتعقم المواد بالأوتوكلاف على درجة ١٢١°م لمدة ١٥ – ٣٠ دقيقة باستعمال البخار تحت ضغط ١٥ رطل على البوصة المربعة . ويختلف الوقت اللازم لاتمام عملية التعقيم حسب نوع ، وكمية المادة التى ستعقم . لاحظ بعناية الخطوات ، والاحتياطات التى تتخذ أثناء العمل بالأوتوكلاف بمراجعة الجزء الأول من خطوات العمل لهذا التدريب .

كثير من المواد ، مثل بعض السكريات وسيروم الدم ، تتحلل بالحرارة المستعملة فى التعقيم . ولتعقيم هذه المواد ، إذا كانت سوائل أو مواد فى محلول .. يستعمل الترشيح filtration ، حيث تزيل المرشحات الميكروبات من السائل بطريقتين :

١ – بالتأثير الميكانيكى – المماثل لعمل الغربال – الناتج من حجز ثقوب المرشح الدقيقة للميكروبات .

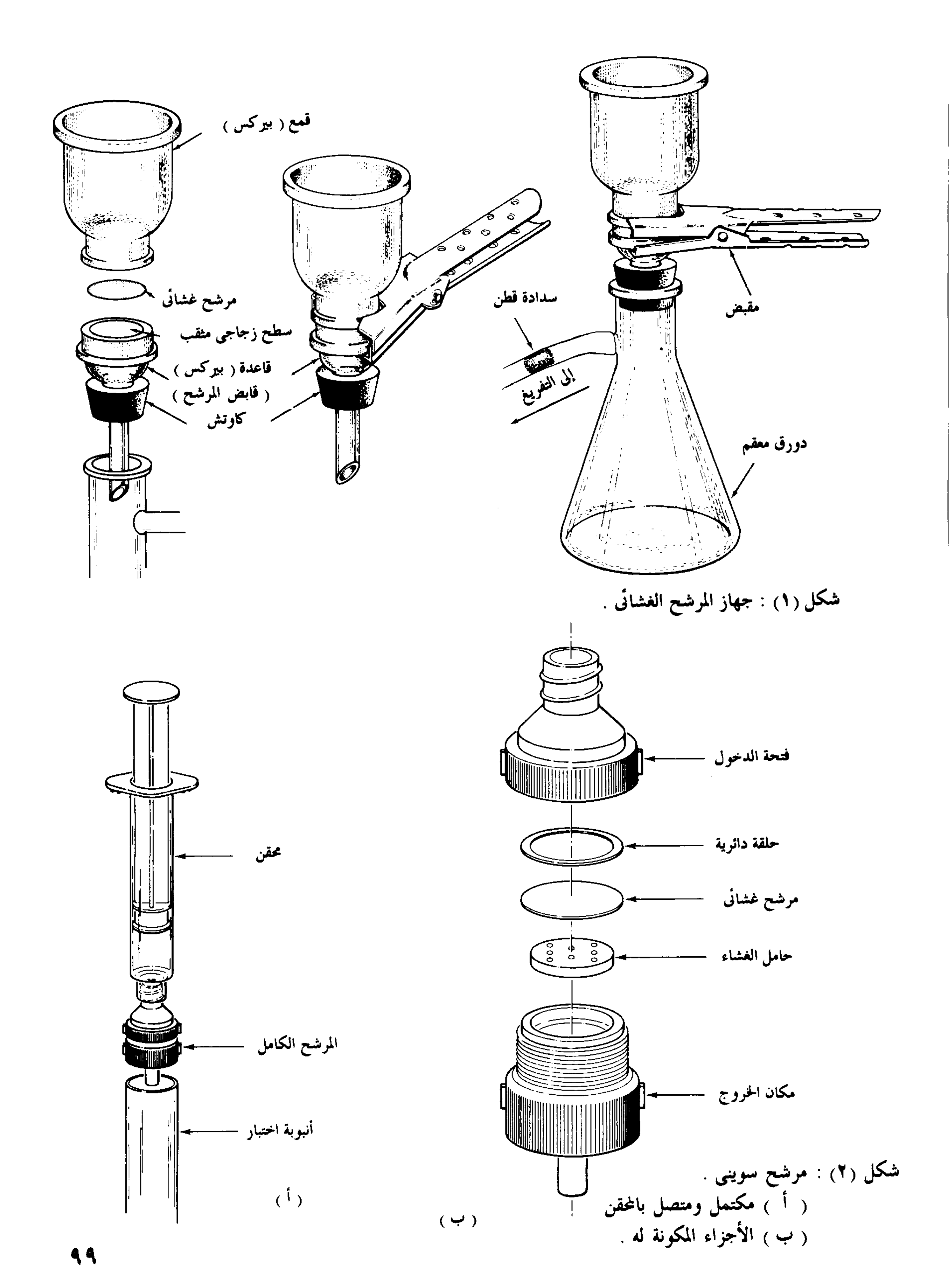
٢ – أو بواسطة ادمصاص المرشح للميكروبات لاختلاف الشحنات الكهربائية التى بين المرشح والميكروبات .

يعتبر المرشح الغشائى membrane filter (انظر شكل ١) من المرشحات المستعملة بكثرة فى الميكروبيولوجى . والمرشح الغشائى عبارة عن سليلوز ، أو غشاء من البلاستيك ، ثقوبه ذات حجم صغير (عادة ٠,٤٥ ميكرومتر) تكفى لحجز وإزالة البكتيريا من المحلول (انظر تدريب ٦٩) . وتوجد أيضا أنواع من المرشحات الغشائية ذات ثقوب أصغر تزيل بكفاءة الفيروسات ، والجزيئات الدقيقة جدًا .

وتوجد نظم مختلفة من المرشحات الغشائية ، منها ما يناسب تعقيم الأحجام الصغيرة للمحاليل المعملية ، مثل مرشح سوينى Swinney filter المزود بمحقن syringe كما هو موضح (بشكل ٢) . كما توجد مرشحات غشائية قادرة على ترشيح آلاف اللترات ، وهى تستعمل فى الصناعة لتعقيم المضادات الحيوية ، والمشروبات وغيرها (انظر شكل ٣) .

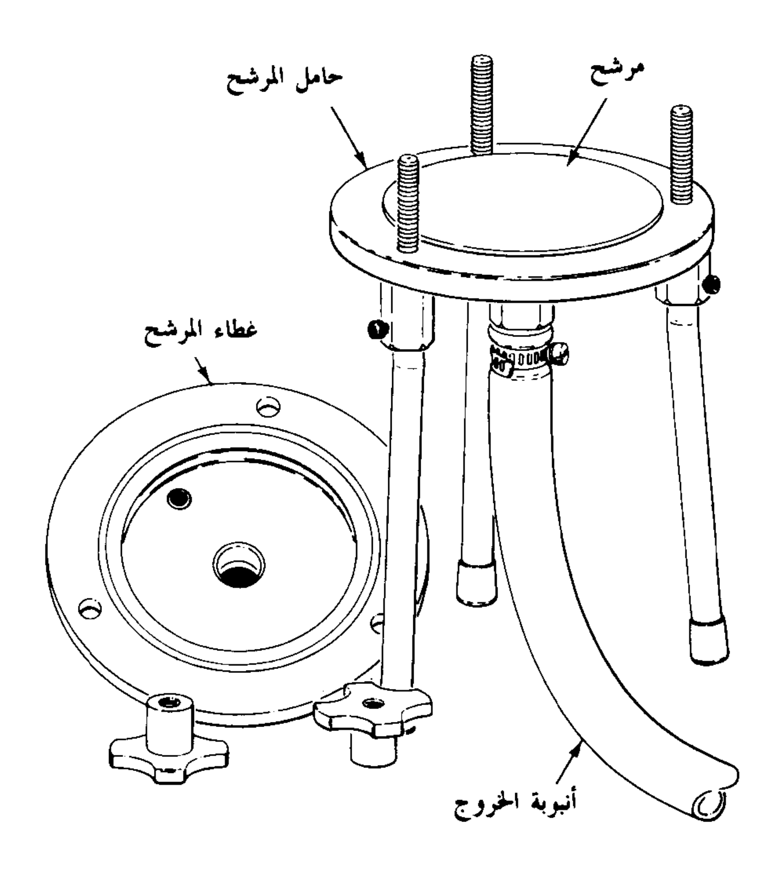
ومن المرشحات الأخرى المستعملة فى التعقيم ما يلى :

مرشح الزجاج المصنفر Sintered-glass ، مرشح سايتس Seitz (أقراص من الأسبستوس) ، ومرشح تشامبرلاند Chamberland ، ومرشح سيلاس ذو الشمعة Selas candle-type ، ومرشح ماندلر Mandler .



شكل (١) : جهاز المرشح الغشائى .

شكل (٢) : مرشح سوينى .
(أ) مكتمل ومتصل بالمحقن
(ب) الأجزاء المكونة له .



شكل (٣) : جهاز الترشيح الغشائى الثلاثى لأحجام من ١ - ١٠ لتر .

يصنع مرشح الزجاج المصنفر من زجاج بيركس ، أو ينا Pyrex or Jena glass ، وهو زجاج مصهور ومصنع بطريقة مسامية ، حجم الثقوب به وشحنة الادمصاص التى عليه تكفى لحجز البكتيريا .

مرشح سايتس عبارة عن أقراص من الأسبستوس المضغوط ، ذات مسامية صغيرة تكفى لحجز البكتيريا . ويصنع مرشح تشامبرلاند وسيلاس من الخزف غير المصقول unglazed porcelain ، بينما يتكون مرشح ماندلر من الطين الدياتومى diatomaceous earth . هذه الأنواع الثلاثة الأخيرة من المرشحات ، عبارة عن : أسطوانة طويلة مجوفة ، مقفلة من جهة واحدة ، ولها شكل الشمعة .

كل أنواع المرشحات السابقة تتصل بزجاجة تفريغ (زجاجة مرتبطة بمضخة تفريغ) ، تمر السوائل من المرشح إلى الزجاجة بتأثير خلخلة الضغط ، تاركه خلفها على المرشحات كل الميكروبات الملوثة .

افحص العرض الخاص بالمرشحات المستعملة كوسائل للتعقيم .

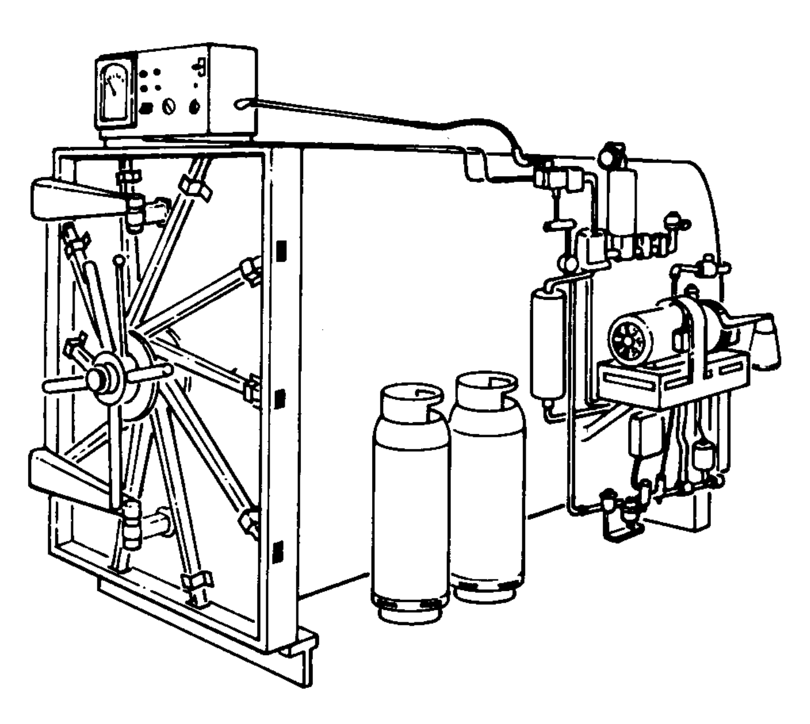
يعتبر التعقيم الغازى gaseous sterilization من وسائل التعقيم التى بدأت تأخذ اهتمامًا متزايدًا ، ويستعمل لذلك غاز أكسيد الإيثيلين Ethylene oxide وبعض أبخرة الغازات الأخرى . ورغم أن

معامل كثيرة غير مزودة بالمعدات الخاصة لإجراء عملية التعقيم الغازى ، إلا أنه يجب عليك أن تلم باستعمالها ومعرفة مميزاتها . فاستعمال أبخرة أكسيد الإيثيلين المضغوط – بأجهزة خاصة تشبه جهاز الأوتوكلاف المعدل – أصبح طريقة شائعة الاستعمال فى عمليات التعقيم البارد Cold sterilization (انظر شكل ٤) .

إن أكسيد الإيثيلين شديد السمية للفيروسات والبكتيريا والفطر ، والجراثيم الداخلية الشديدة المقاومة للحرارة . وكعامل يستعمل فى التعقيم .. فإن أكسيد الإيثيلين سهل التداول بالأجهزة المناسبة ، كما أنه غير مكلف . وعلى عكس كثير من الكيميائيات الأخرى السامة .. فإنه نسبيا لايسبب تآكلاً ولا يحدث ضررًا للمواد المعقمة ، كما يسهل التخلص من الكميات المتبقية منه بالتهوية .

رغم أن غاز الإيثيلين قابل للاشتعال ، فإن استعمال ١٠٪ أكسيد إيثيلين مع ٩٠٪ ثانى أكسيد الكربون ، أو خليط مع غاز الفريون Freon ، ليس فقط عامل تعقيم فعال ، ولكن أيضا غير قابل للاشتعال ، أو الانفجار .

من مساوئ غاز أكسيد الإيثيلين ، أن استعماله فى التعقيم يحتاج إلى فترات تعريض طويلة (عدة ساعات) ، كما أنه قد يتفاعل مع بعض مكونات البيئة ، وبعض أنواع البلاستيك ، وقد تتبقى منه بعض الآثار بعد عملية التعقيم التى يجب التخلص منها بالتهوية ، أو بترك المادة المعقمة لفترة بعد التعقيم .



شكل (٤) : جهاز التعقيم بأكسيد الإيثيلين .

ويعتبر الإشعاع Irradiation من طرق التعقيم الأخرى المستعملة مع بعض المواد مثل : المواد الصيدلانية ، فتستعمل أشعة مؤينة عالية الطاقة ، مثل أشعة جاما التى مصدرها كوبالت ٦٠ ، أو سيزيوم ١٣٩ (Caesium-139) ، وأشعة الكاثود من مولد للإليكترونات .

لا يعتبر التشعيع باستعمال الأشعة فوق البنفسجية وسيلة كافية للتعقيم ، بسبب قلة نفاذية الأطوال الموجية لهذه الأشعة .

طريقة العمل PROCEDURE

تشغيل جهاز الأوتوكلاف (المعقم بالبخار المضغوط)

Operation of the Pressure-Steam Sterilizer, Autoclave

١ – ضع على أرفف المعقم دوارق البويون المغذى السابق تحضيرها فى تدريب (١٣) .

٢ – اقفل باب المعقم بالبخار ، واحكم قفله تماما بواسطة المشابك اللولبية .

٣ – افتح صمام التشغيل (فتحة خروج الهواء) operating valve ليخرج جميع الهواء الموجود بداخل الجهاز ويحل محله البخار .

٤ – افتح صمام دخول البخار steam-supply valve ، ليدخل البخار إلى غرفة التعقيم .

٥ – راقب الترمومتر حتى تصل درجة الحرارة إلى ١٠٠°م ، عندئذ اقفل صمام التشغيل . عند هذا الوقت يكون جميع الهواء والمياه المكثفة قد خرجا من غرفة التعقيم وامتلئ الجهاز بالبخار ، بعد قفل الصمام يبدأ الضغط فى الارتفاع .

فى بعض الأجهزة .. يُقفل الصمام تلقائيًّا بواسطة منظم ثرموستاتى .

٦ – استمر فى مراقبة الترمومتر لأن الحرارة ستستمر فى الارتفاع . ودرجة حرارة البخار النقى عند ضغط واحد جوى لاتزيد عن ١٠٠°م ، ولكى ترتفع الحرارة عن هذه الدرجة يجب أن يضغط البخار . وتزود معظم أجهزة التعقيم الحديثة بمنظمات regulators للتحكم فى ضغط البخار ، وبالتالى فى درجة الحرارة بداخل الجهاز .

بالنسبة لأعمال التعقيم الروتينية بالمعمل .. فإن جهاز الأوتوكلاف يُضغط عادة ليعطى ضغطاً قدره ١٥ رطل على البوصة المربعة ، أى درجة حرارة قدرها ١٢١°م . هذه الدرجة مناسبة للتعقيم إذا استمرت لمدة ١٥ دقيقة . وعلى ذلك .. فعند وصول درجة الحرارة إلى ١٢١°م ، ابدأ فى حساب المدة المطلوبة للتعقيم .

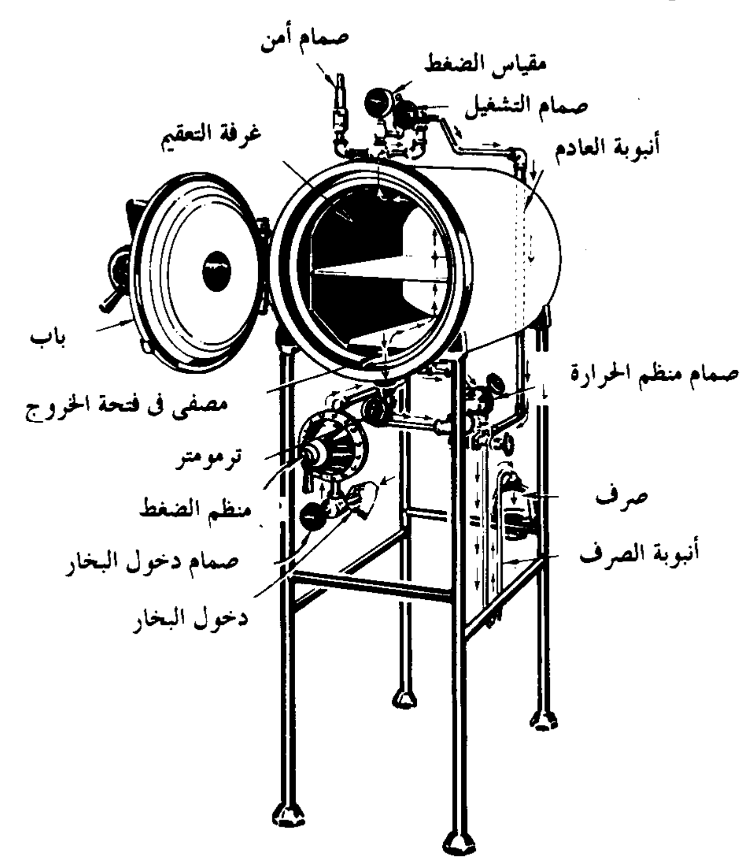
لاحظ أن الترمومتر يقيس حرارة البخار الخارج فى أنبوبة التصريف discharge line . إذا

لم يكن قد تم التخلص تماما من الهواء الموجود بداخل الأوتوكلاف ، فالبرغم من أن مقياس الضغط يبين ١٥ رطلاً ، إلا أن الحرارة لن تصل بالترمومتر إلى ١٢١° م . لذلك .. فإنه من الضرورى أن تبدأ فى حساب المدة المطلوبة للتعقيم بدءاً من اللحظة التى تصل فيها قراءة الترمومتر إلى ١٢١° م ، وليس من بداية قراءة جهاز الضغط ١٥ رطلاً .

٧ - لإيقاف الأوتوكلاف عن العمل عقب انتهاء عملية التعقيم ، اقفل صمام دخول البخار وانتظر حتى ينخفض الضغط تدريجيّا ، وتعود قراءة مقياس الضغط إلى صفر (أى إلى الضغط الجوى العادى) .

إذا فتح الجهاز قبل أن تصل قراءة مقياس الضغط إلى صفر ، فإن السوائل الجارى تعقيمها ، نتيجة الانخفاض الفجائى فى الضغط إلى الضغط الجوى العادى ، تغلى بشدة فى أوعيتها ويُفقد جزء منها ، كما أن سداداتها ستبتل وقد تنزع بعيدا . لذلك فإنه من الضرورى أن يترك الضغط بالجهاز لينخفض تدريجيا ، خاصة إذا كانت المواد الجارى تعقيمها سوائل .

تزود أجهزة الأوتوكلاف الحديثة - وكثير منها الآن يعمل بشكل آلى (أوتوماتيكى) - بمعدات على أبوابها لاتسمح بفتحها قبل أن ينخفض ضغط الجهاز إلى الدرجة المطلوبة .

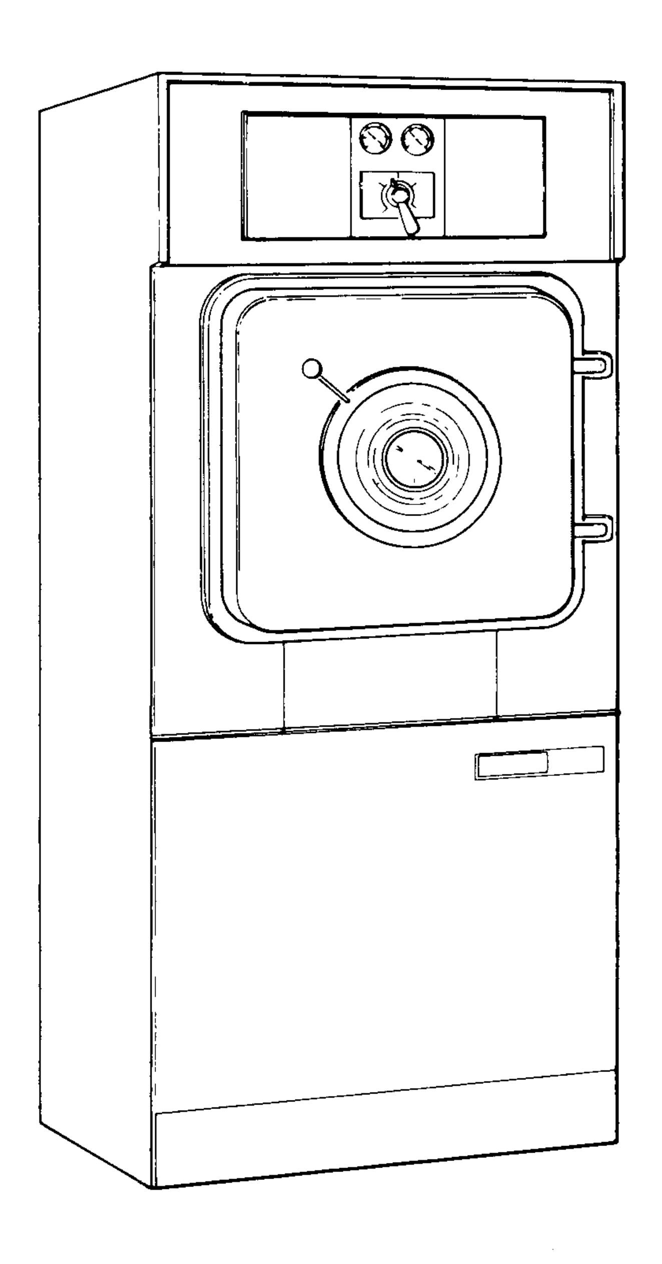


شكل (٥) : التركيب الأساسى للأوتوكلاف (المعقم بالبخار المضغوط) .

٨ – بعد أن يبين مقياس الضغط أنه لايوجد ضغط بالجهاز ، يفتح باب الأوتوكلاف لإخراج ما به من مواد . إذا كانت هذه المواد عرضة للتلف من استمرار الحرارة ، أو من التبخير ، برّدها بسرعة .

يبين شكل (٥) التركيب الأساسى للأوتوكلاف ، ليساعد فى فهم عملية التعقيم .

ويبين شكل (٦) جهاز أوتوكلاف حديثاً ، وفى هذا الجهاز تنظم كل عملية التعقيم بشكل أوتوماتيكى .



شكل (٦) : أوتوكلاف أوتوماتيكى حديث .

بعض العوامل المؤثرة فى عملية التعقيم بالبخار المضغوط

Some Factors in Pressure-Steam Sterilization

الحرارة Temperature

إن الجراثيم الداخلية للبكتيريا من صور الحياة الشديدة المقاومة للموت بواسطة الحرارة . ويمكن فقط الوصول إلى درجة الحرارة القاتلة عندما يكون البخار مضغوطا . وتعتبر درجة حرارة ١٢١°م كافية لهذا الغرض إذا استمرت للفترة المناسبة من الوقت .

الرطوبة Moisture

يتطلب تجمّع (تخثر) Coagulation البروتوبلام البكتيرى (البروتينات ، الإنزيمات ... إلخ) عند درجات الحرارة المعتدلة رطوبة . فإذا لم تتوفر الرطوبة .. فإن الحرارة اللازمة لتجميع البروتين تزيد كثيرا . وكلما ارتفعت درجة حرارة البخار زاد جفافه . لذلك .. فإن درجة الحرارة ومدة التعريض اللازمة للتعقيم ، سوف تزيد لتصل إلى ما يقرب من حالة التعقيم بالهواء الساخن (١٧٠°م لمدة ساعة) اذا ارتفعت درجة حرارة البخار عن اللازم . وعلى ذلك .. فإن البخار الزائد التسخين قد يفقد بعض كفاءته كعامل لقتل الميكروبات ، بالإضافة إلى أن زيادة درجة الحرارة قد تكون ضارة بالمواد الجارى تعقيمها .

الضغط Pressure

ليس للضغط تأثير فى عملية التعقيم على المدى المستعمل بالأوتوكلاف ، غير أن الضغط مطلوب فقط للوصول بالبخار إلى درجة حرارة أعلى من ١٠٠°م .

الوقت Time

الوقت مطلوب كى يتمكن البخار من النفاذ وتسخين المواد لدرجة حرارة التعقيم المطلوبة . وحتى عند الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة .. فإن الجراثيم (والخلايا الخضرية) لاتقتل كلها فى الحال . فمعدل الموت ثابت عند درجة حرارة معينة . وفى كل وحدة زمن تتعرض خلاله الميكروبات لعامل قتل ، فإن نسبة ثابتة من الميكروبات تموت . وعادة .. فإن قتل الجراثيم الداخلية للبكتيريا الحية المحبة للحرارة المرتفعة يحتاج لمدة ١١ - ١٢ دقيقة عند درجة ١٢١°م (حرارة رطبة) .

الهواء المحتجز Entrapped Air

يكون الهواء البارد الموجود بغرفة تعقيم الأوتوكلاف أثقل بمقدار مرتين ، أو أكثر من البخار عند درجة حرارة التعقيم . فإذا لم يسمح للهواء بالخروج .. فإن طبقات من الهواء ، والبخار ستتكون داخل غرفة التعقيم . ونظرًا لأن الهواء والبخار بطيءُ الاختلاط ، فإن الاختلاف فى درجات الحرارة

بين الطبقات العليا ، والسفلى سيكون كبيرا جدًّا . وحتى إذا ما تم اختلاط الهواء بالبخار ، فإن محصلة الحرارة الناتجة قد تكون أقل من تلك المطلوبة . ومن هنا يتبين أهمية الإحلال الكامل للهواء بواسطة البخار . إذا ما وصلت قراءة الترمومتر الموجودة على فتحة خروج البخار إلى درجة ١٠٠°م ، فمعنى ذلك أنه تم التخلص من كل الهواء الموجود بالأوتوكلاف .

طبيعة المواد المطلوب تعقيمها — Nature of the Load

عموما .. فإن المواد الضخمة وغير المنفذة للبخار تحتاج فى تعقيمها لوقت أطول ؛ لذلك فإنه من الأنسب أن تعقم المواد فى أصغر عبوات مناسبة . مثلا .. نجد أن تعقيم ٥ لترات فى خمسة دوارق كل منها يسع لتراً ، أفضل من تعقيمها فى دورق واحد سعته ٥ لترات .

يجب أن تسد الدوارق بأغطية قطنية . إذا كانت هناك ضرورة لاستعمال سدادات من الكاوتش ، أو أغطية من البلاستيك ، أو أغطية محوية ، فيجب أن توضع فى مكانها بدون إحكام للسماح للهواء بالخروج وللبخار بالدخول بسهولة ، وأيضا لتجنب انفجار الأوانى ، أو طرد السدادات أثناء تشغيل البخار .

أسـئلة — QUESTIONS

١ – ما هى النظرية التى تعتمد عليها عملية التعقيم المتقطع ؟

٢ – أيهما أكثر كفاءة فى عملية التعقيم : الحرارة الجافة أم الحرارة الرطبة . ولماذا ؟

٣ – ما هى درجة الحرارة الفهرنهيتية التى تعادل ١٧٠°م ؟

الباب الخامس

تقدير أعداد الميكروبات

THE DETERMINATION OF MICROBIAL NUMBERS

من الناحية العملية .. تتطلب كل حالة من حالات الميكروبيولوجى طرقا لقياس أعداد الميكروبات ، سواء بتقدير أعداد الخلايا Cell numbers ، أو بحساب كتلة الخلايا Cell masses . وتفيد الطرق التى تقدر أعداد الخلايا – أساسا – فى عد الكائنات الوحيدة الخلية مثل : البكتيريا ، والخميرة . أما طرق تقدير كتلة الخلايا .. فهى تستعمل لكل الأنواع الميكروبية التى تتضمن الأنواع الخيطية الطويلة مثل الفطريات التى لا يمكن عدها بتقدير أعداد الخلايا .

أكثر الطرق شيوعا لتقدير أعداد الخلايا ، هى طريقة العد بالأطباق Plate count ؛ أى عد المستعمرات Colony count . تبنى هذه الطريقة على العلاقة النظرية بأن الخلية الواحدة من البكتيريا ، أو تجمع الخلايا clump of cells ، تكون مستعمرة واحدة ، وكذلك تبنى على الافتراض بأن عدد المستعمرات التى تتكوّن بطبق الآجار تعادل عدد الخلايا الأصلية . وستُناقَش هذه الطريقة فى تدريب (١٥) .

فى طريقة العد بالتخفيف Dilution Count ، تعمل تخفيفات متسلسلة من العينة ، ثم تلقح هذه التخفيفات فى مجموعة من أنابيب البيئة السائلة بدلاً من صبها بالأطباق . بعد التحضين .. فإن الأنابيب المحتوية على خلايا نامية ستظهر عكرة اللون Turbid ، بينما تظل بعض الأنابيب الملقحة بالتخفيفات العالية رائقة ؛ أى خالية من النمو ، مما يعنى أن اللقاح المضاف لا يحتوى على خلايا حية .

يقدر النمو من أعلى تخفيف من العينة يعطى نموا . فى تدريب (٦٨) ستستعمل طريقة معدلة للعد بالتخفيف لتقدير أعداد البكتيريا فى عينات المياه .

يمكن عد المستعمرات باستعمال المرشحات الغشائية Membrane filters ، فبمرور العينة خلال مرشح غشائى حاجز للبكتيريا ، ستحجز الخلايا على سطح الغشاء . وبوضع بيئة مناسبة .. فإن الخلايا المحجوزة ستنمو على سطح المرشح الغشائى ، وسيدل عدد المستعمرات النامية على عدد

البكتيريا فى العينة . وفى تدريب (٦٩) سنشرح طريقة استعمال المرشحات الغشائية فى تقدير عدد البكتيريا البرازية fecal bacteria بالماء .

تقدر الطرق المزرعية عدد الخلايا الحية النامية بالبيئة . ويوجد العديد من الطرق التى تقدر بطريقة مباشرة عدد الخلايا الكلية الحية والميتة الموجودة بالعينة . وهذه الطرق المباشرة ليست فى دقة الطرق المزرعية ، وإن كانت لا تحتاج لوقت طويل . ويعتبر العد بطريقة الميكروسكوب المباشرة Direct microscopic count من أكثر الطرق استعمالاً للعد المباشر . وفى هذه الطريقة .. ينشر حجم معلوم من العينة على مساحة محددة بالشريحة . بعد الميكروبات فى مساحة معلومة .. يمكن حسابيًّا تقدير عدد الميكروبات بالعينة الأصلية .

لتسهيل طريقة العمل بهذه الطريقة .. تستعمل غرف عد خاصة Counting chambers مثل شريحة بتروف هوزر Petroff-Hauser slide ، وبهذه الشريحة تجاويف ذات عمق ، وحجم معلوم ، مقسمة إلى مساحات مربعة . بتقدير عدد الميكروبات الموجودة فى مساحة ما (مثلا ٥٠ أو ١٠٠ مربع) فى حجم معين بالشريحة ، فإنه يمكن حساب العدد الكلى للبكتيريا بالعينة الأصلية .

فى طريقة بريد Breed method .. ينشر حجم معلوم من العينة على مساحة ١ سم^{٢} من الشريحة . يجفف الغشاء ، ويثبت ، ويصبغ ، ثم يقدر عدد الميكروبات الموجودة فى عدد كبير من مجالات الميكروسكوب . وبما أن مساحة المجال الميكروسكوبى معروفة ؛ فإنه يمكن حساب عدد البكتيريا فى العينة الأصلية . فى تدريب (٧١) فإنك ستستعمل طريقة بريد لتقدير عدد البكتيريا فى اللبن الحليب .

يمكن عد الخلايا ، أو الجزيئات الدقيقة إليكترونيًّا . فباستخدام عداد كولتر Coulter counter .. تمرر العينة من فتحة صغيرة ، ومن قياس الفرق فى المقاومة الكهربائية فإنه يمكن تقدير عدد ، وحجم الخلايا . ونظرا لأن هذه الطريقة تقيس أى جزيئات دقيقة موجودة بالعينة ، فإنها تصلح فقط لعد الكائنات الدقيقة المعلقة فى محاليل مائية ، ولا تصلح لعد الميكروبات الموجودة بالأراضى مثلا .

إن قياس كتلة الخلايا فى مزرعة ما هو تقدير كلى للبروتوبلازم الحلوى الموجود فى ملليلتر من المزرعة . ومن أكثر الطرق انتشارا لتقدير كتلة الخلايا :

١ – طريقة قياس التعكير

٢ – التقديرات الكيميائية لمكونات الخلية .

٣ – طرق الوزن الجاف .

٤ – طرق حجم الخلية .

طرق قياس التعكير Turbidimetric methods

تستعمل هذه الطرق بكثرة لتقدير كتلة الخلايا . وتعتمد هذه الطرق على حقيقة أن الخلايا فى البيئة السائلة تحجز ، أو تبعثر الضوء بدرجة تتناسب مع كتلة الخلايا الكلية بالمزرعة . وستُناقَش وتشرح هذه الطرق فى تدريب (١٦) .

التقديرات الكيميائية لمكونات الخلية Chemical estimates

تستخدم التقديرات الكيميائية لمعرفة كتلة الخلايا . ويتم ذلك بتقدير كمية بعض المكونات الكيميائية للخلية مثل : النيتروجين ، والبروتين ، والفوسفور ، وحامض DNA . وتحت ظروف قياسية موحدة .. فإن كمية أى مكون بالخلية يعطى تقديرا دقيقا لكتلة الخلايا الكلية الموجودة بالمزرعة .

طريقة الوزن الجاف Dry weight method

يمكن استخدام الوزن الجاف للخلايا ، أو الميسيليوم من حجم معلوم لبيئة النمو ، وذلك لتقدير كتلة الخلايا . فى مثل هذه الطرق .. يجمع النمو من المزرعة بواسطة الطرد المركزى ، أو بواسطة الترشيح ، ثم تغسل الخلايا ، وتجفف ، وتوزن .

طرق حجم الخلية Cell-volume methods

يقدر حجم الخلية بوضع كمية قياسية من مزرعة سائلة فى أنابيب مقيمة calibrated بجهاز الطرد المركزى . بعد عملية الطرد المركزى .. يقاس حجم الكريات المبتلة wet pellets .

تدريب (١٥)

طرق العد بالأطباق Quantitative Plating Methods

حيث إن الخلية الحية الواحدة ، أو كتلة الخلايا (الوحدة المكوّنة للمستعمرة Colony-forming unit, CFU) ، تنمو لتكوّن مستعمرة واحدة ، فإنه يمكن استخدام الأطباق لتقدير عدد البكتيريا بالعينة . لعد البكتيريا بطريقة مأمونة .. تخفّف العينة ، ثم توضع بأطباق البيئة . وبعد التحضين .. تعد المستعمرات المتكونة بالطبق . يحسب بعدئذ عدد البكتيريا بالعينة الأصلية بضرب عدد المستعمرات المتكونة فى معامل تخفيف العينة dilution factor المستعمل للطبق الجارى عده . ويعبر عن التخفيف عادة بالأس السالب ، فتستعمل مثلا ١٠^-٥ بدلا من $\frac{١}{١٠٠٠٠٠}$.

تستخدم طريقتان رئيستان للعد بالأطباق : الأطباق المنتشرة ، والأطباق المصبوبة . وفى كلتا

الطريقتين تجرى تخفيفات للعينة الأصلية وتوضع بالأطباق .

فى طريقة الأطباق المنتشرة spread plate method .. توزع العينة الجارى فحصها على سطح أطباق الآجار المغذى ، وبعد التحضين تعد المستعمرات المتكونة .

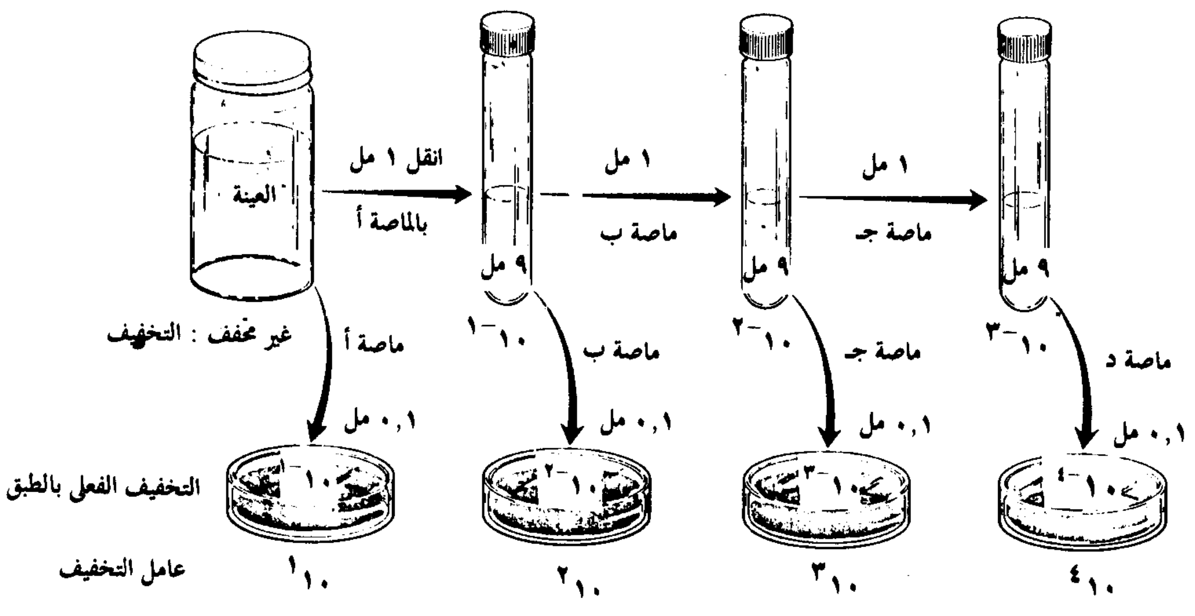
فى طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method .. توضع العينة فى طبق بترى معقم ، وتصب عليها أنبوبة بيئة الآجار المنصهر (٤٥° م) . بعد التحضين تعد المستعمرات المتكونة .

لتخفيف العينة كميا .. يؤخذ ١ جم ، أو ١ مل من العينة ، ثم تخفف على خطوات فى أنابيب ، أو زجاجات ، أو دوارق تحتوى على كميات معلومة من محلول منظم معقم . من المحاليل المستعملة محلول الفوسفات المنظم phosphate buffer solution (٣٤ جم KH_2PO_4 فى ٥٠٠ مل ماء ، يضبط قيد إلى ٧,٢ بواسطة ٠,١ ع NaOH ، ثم يكمل المحلول إلى لتر . عند الاستعمال يخفف ١ مل إلى ٨٠٠ مل) .

يمكن تبسيط العمل إذا قمت بترتيب أطباق بترى ، وأنابيب التخفيف فى بداية إجراء التقدير — اكتب على الأطباق وأنابيب التخفيف بيانات التخفيف المستعمل بكل منها ، واكتب أيضا على الأطباق البيانات الأخرى المطلوبة .

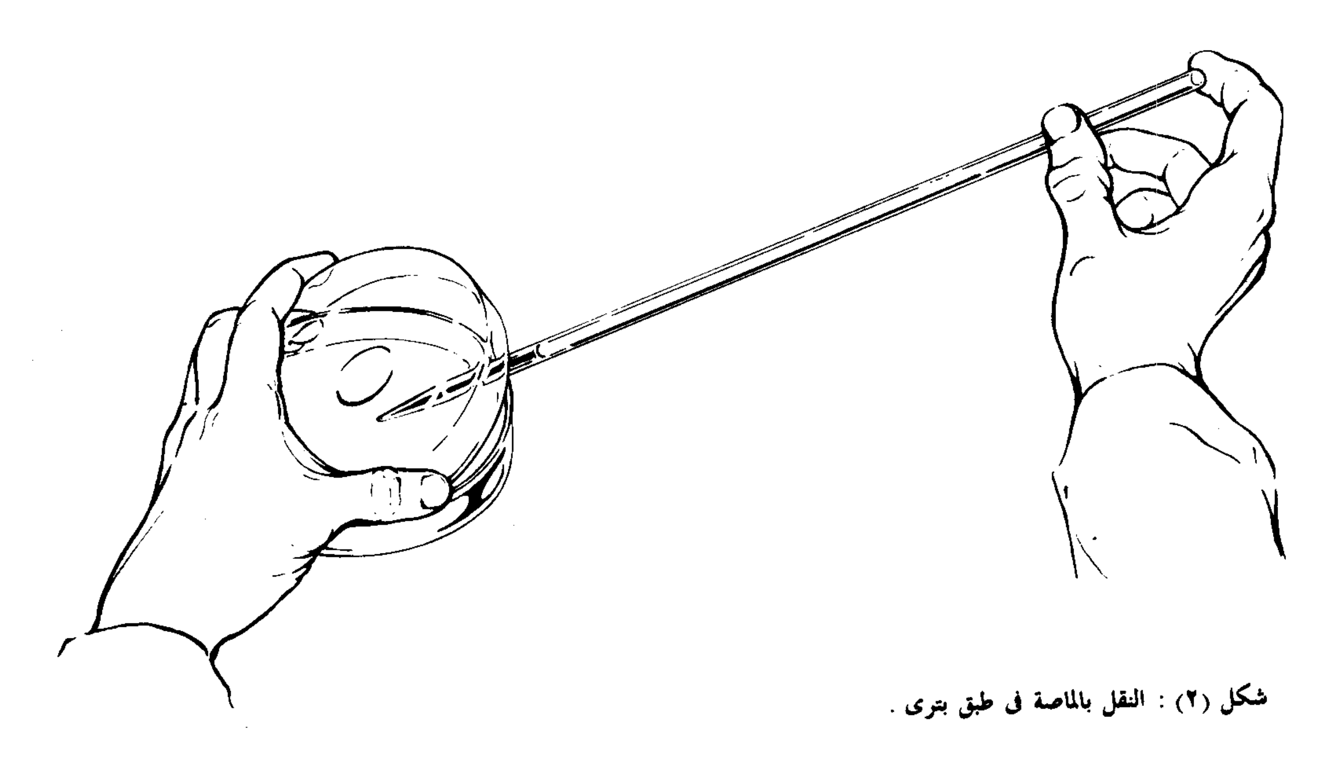
الأطباق المنتشرة Spread Plate

فى هذا التدريب .. ستضيف ١ مل من العينة المقدمة لك إلى أنبوبة بها ٩ مل من محلول التخفيف ، فيصبح التخفيف ١/١٠ من العينة الأصلية . باستمرار إجراء التخفيف خطوة خطوة بأنابيب التخفيف .. فإنك ستخفف العينة إلى ١٠^-٢ ، ١٠^-٣ وأكثر بالطريقة الموضحة فى شكل (١) . تأكد من تغيير الماصة مع كل أنبوبة تخفيف ، ورقّم كل أنبوبة بعلامة دالة على تخفيفها .



شكل (١) : تخفيف العينة للأطباق المنتشرة (طريقة أطباق كمية) .

انشر ١٠/١ مل من كل أنبوبة تخفيف على سطح طبق الآجار (انظر شكل ٢) . وبعد التحضين .. عد عدد المستعمرات النامية بالطبق لتقدير عدد الخلايا فى هذا التخفيف ، وباستعمال معامل التخفيف يمكن حساب عدد الخلايا بالعينة الأصلية .



شكل (٢) : النقل بالماصة فى طبق بترى .

طريقة العمل PRDCEDURE

١ – جهز ثلاث أنابيب تخفيف ، وأربعة أطباق آجار مغذى . اكتب على الأنابيب ١٠$^{-1}$ ، ١٠$^{-2}$ ، ١٠$^{-3}$ وعلى الأطباق ١٠$^{-1}$ إلى ١٠$^{-4}$.

٢ – بماصة معقمة خذ ١,١ مل من عينة الماء ، ضع ٠,١ مل على سطح آجار طبق ١٠$^{-1}$ ، وضع الباق (١ مل) فى الأنبوبة الأولى تخفيف ١٠$^{-1}$ المعقمة . تحتوى هذه الأنبوبة على ١ مل من العينة الأصلية مخففة ١٠ مرات ، وعلى ذلك .. فإن ١ مل من هذا التخفيف يعادل ٠,١ مل من العينة الأصلية . اخلط المحتويات جيدًا بإدارة الأنبوبة بين الكفين ، أو برج الأنبوبة ، أو باستعمال خلاط فورتكس (شكل ٥ – تدريب ٧) .

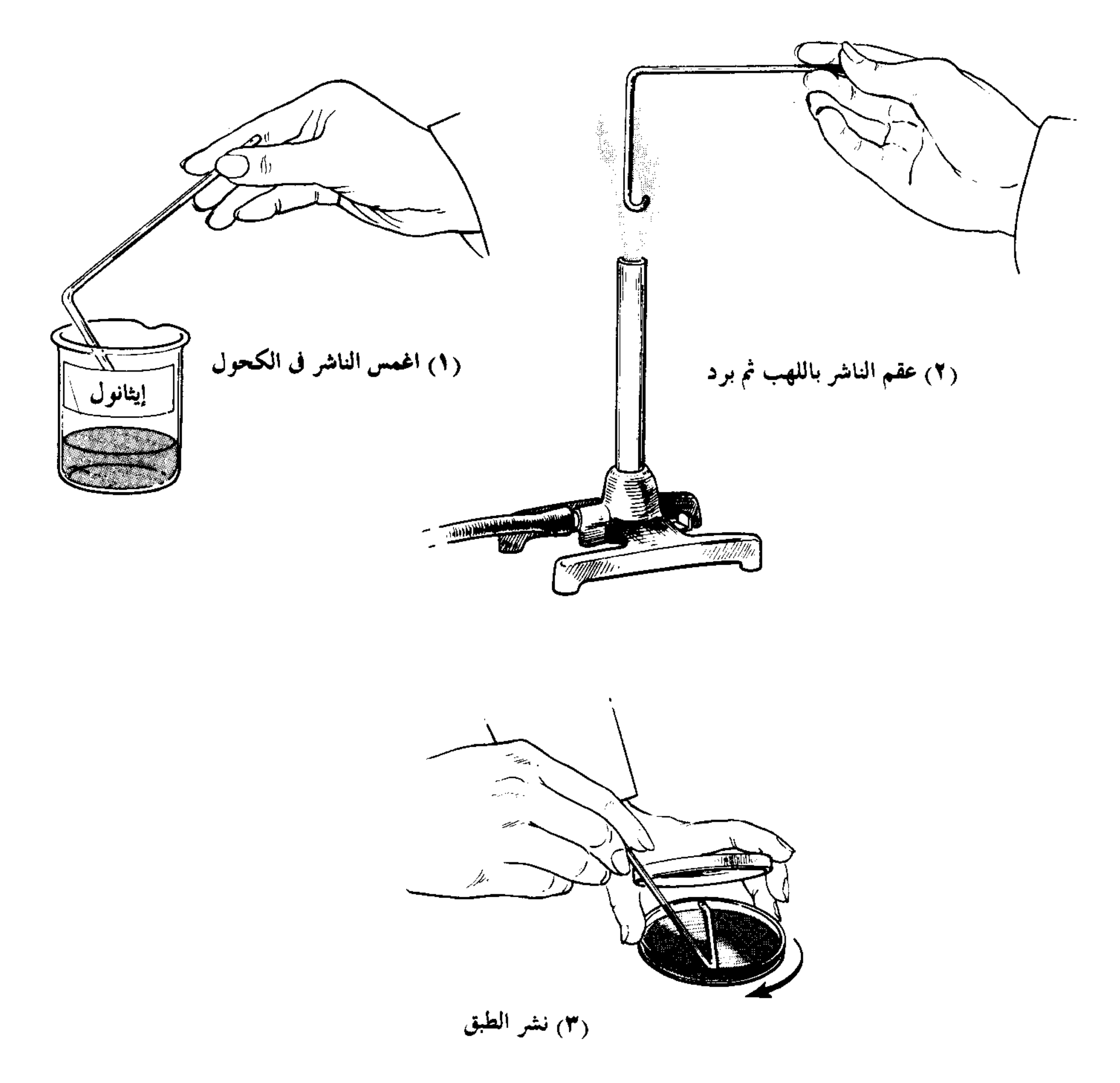
٣ – بماصة أخرى معقمة .. خذ ١,١ مل من أنبوبة تخفيف ١٠$^{-1}$ ، ضع ٠,١ مل على سطح آجار طبق ١٠$^{-2}$ ، وضع الباق (١ مل) فى الأنبوبة الثانية تخفيف ١٠$^{-2}$ المعقمة . اخلط جيدا بماصة أخرى معقمة ، وخذ ١,١ مل من أنبوبة تخفيف ١٠$^{-2}$ ، وضع ٠,١ مل على سطح آجار طبق ١٠$^{-3}$ ، وضع الباق (١ مل) فى الأنبوبة الثالثة تخفيف ١٠$^{-3}$ المعقمة . بعد رج الأنبوبة .. انقل ٠,١ مل من هذا التخفيف الأخير بماصة معقمة إلى سطح آجار طبق ١٠$^{-4}$.

٤ – انشر العينة بكل طبق مستعملا ناشرًا spreeader زجاجيًّا معقمًا كما هو موضح بشكل (٣) . ويعقم الناشر بغمسه فى الكحول ، ثم يحرق الكحول فى اللهب ، ثم يُترك ليبرد تمامًا .

انشر العينة على سطح آجار الطبق بإدارة الطبق على سطح المنضدة .

٥ – حضن أطباق بترى مقلوبة على درجة ٣٠° م حتى الدرس العملى التالى .

٦ – عد المستعمرات بكل طبق يحتوى على عدد مستعمرات يتراوح ما بين (٢٠ – ٢٠٠) مستعمرة .



(١) اغمس الناشر فى الكحول

(٢) عقم الناشر باللهب ثم برد

(٣) نشر الطبق

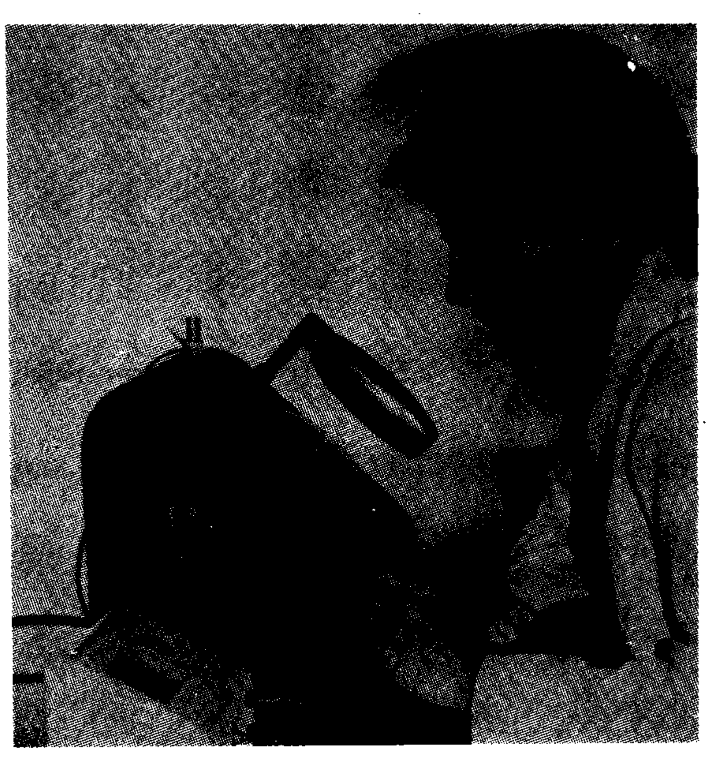
شكل (٣) : خطوات نشر الطبق (قد يلف القضيب الزجاجى الناشر بورق سميك ويعقم بالأوتوكلاف ، ثم يخزن ، وعند الاستعمال يزال الورق) .

عد الأطباق Counting Plates

يمكن عد المستعمرات النامية بأطباق الآجار باستعمال أجهزة مناسبة ، مثل .. عداد مستعمرات كويبك Quebec colony counter . هذا الجهاز مزود بمصدر إضاءة وعدسة تكبير (انظر شكل ٤) . أثناء العد .. علم كل مستعمرة ، ثم عدها بقلم لتجنب تكرار العد .

عند إجراء العد لعدد كبير من الأطباق فى الأعمال الروتينية .. فإنه تستعمل عدادات إليكترونية .

تتكون المستعمرات المسماة بالمنتشرة spreaders غالبا فى أغشية رطبة moisture films على سطح الآجار ، أو بين الآجار وقاع طبق بترى . استبعد الأطباق المحتوية على مستعمرات منتشرة كبيرة وتغطى مستعمرات أخرى . إذا كانت المستعمرات المنتشرة صغيرة ومتباعدة .. فيمكن عدها كمستعمرات فردية . وغالبا .. فإن المستعمرات المنتشرة السائد وجودها ، تكون صغيرة ، رمادية اللون ، غشائية .



شكل (٤) : عد المستعمرات على عداد المستعمرات كويبك .

حساب أعداد البكتيريا Calculation of Count

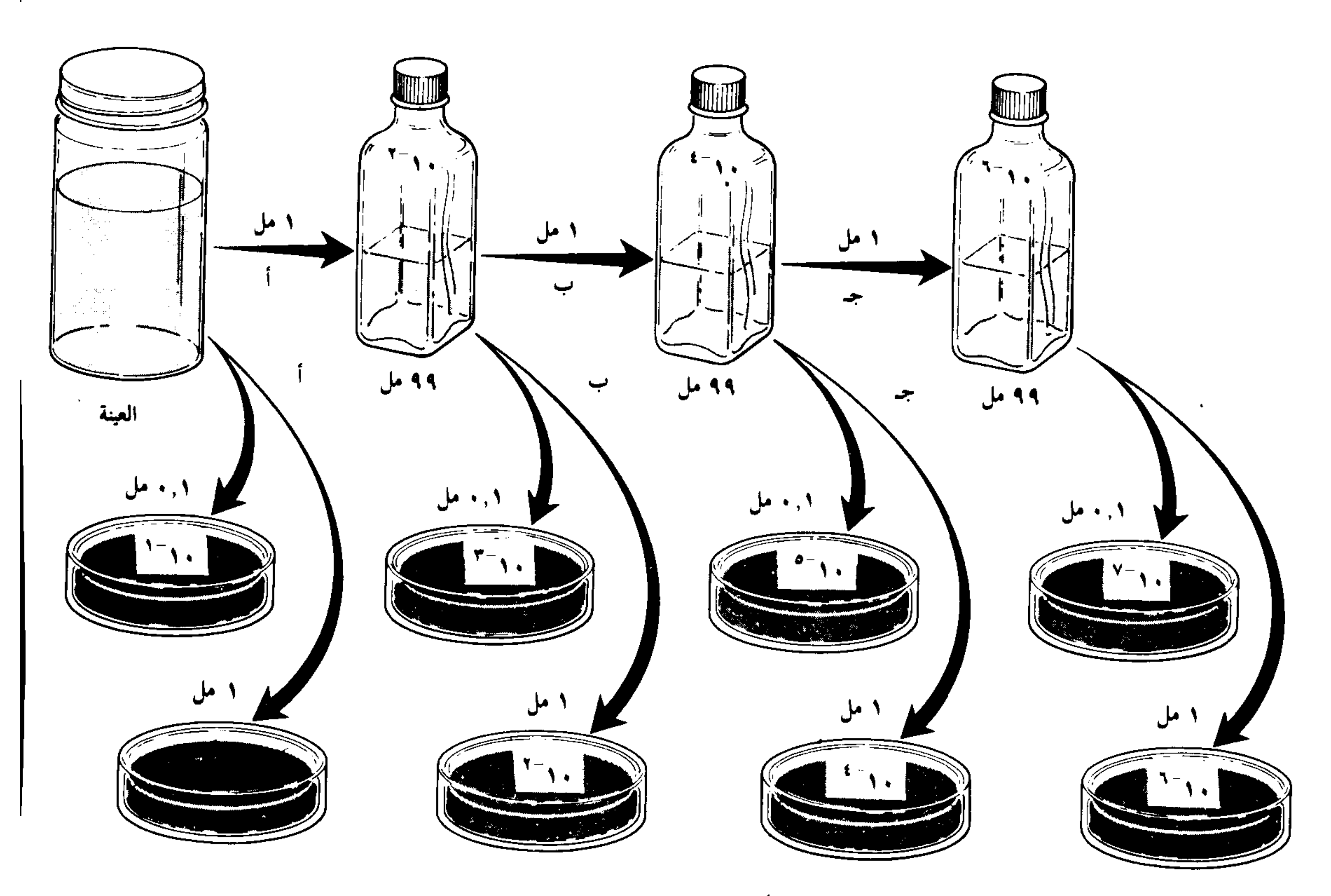
يحسب عدد خلايا البكتيريا ، أو الوحدات المكونة للمستعمرات الموجودة فى ١ مل من العينة الأصلية ، ويضرب عدد المستعمرات بالطبق × معامل التخفيف . فمثلاً .. إذا كان عدد المستعمرات النامية ١٥٠ مستعمرة فى طبق تخفيف ١٠$^{-٣}$ ، فإن عدد البكتيريا فى العينة الأصلية = ١٥٠ × ١٠٠٠ = ١٥٠٠٠٠ بكتيريا لكل ١ مل عينة أصلية .

ينصح بعمل طبقين من كل تخفيف . يؤخذ المتوسط الحسابى لعدد المستعمرات النامية بالطبقين ، ويقرب المتوسط إلى أقرب رقم ثانى معنوى ، ومنه يحسب عدد الخلايا بالعينة الأصلية .

فمتوسط أعداد ١٤٨ ، ١٥٤ فى طبق تخفيف ١٠^-٣ = ١٥١ مستعمرة ، ويكون عدد البكتيريا بالعينة الأصلية هو ١٥٠٠٠٠ بكتيريا لكل ١ مل .

الأطباق المصبوبة Pour Plate

فى هذا التدريب ..سيقدر عدد البكتيريا الموجودة فى عينتى ماء أ ، ب . العينة أ نوعها جيد ، وتحتوى على عدد قليل من البكتيريا . العينة ب ، عينة غير نقية تحتوى على أعداد كبيرة من البكتيريا ، لذا يجب تخفيفها لإمكان الحصول على أطباق مناسبة يمكن عد المستعمرات النامية بها — لعمل هذا التخفيف ، أضف ١ مل من عينة الماء إلى زجاجة التخفيف الأولى المحتوية على ٩٩ مل من محلول التخفيف المعقم ، وبذلك ستخفف العينة الأصلية ١٠٠ مرة . بالاستمرار فى عملية التخفيف خطوة خطوة فى زجاجات التخفيف ، فإن العينة ستخفف إلى ١٠^-٤ ، ١٠^-٦ وأكثر — وبنقل ١ مل و ٠,١ مل من زجاجة العينة ومن كل زجاجة تخفيف ، فإنك ستحصل على عينات بالأطباق ذات تخفيف ١ ، ١٠^-١ ، ١٠^-٢ ، ١٠^-٣ ... وأكثر (انظر شكل ٥) .



شكل (٥) : تخفيف العينة لطريقة العد بالأطباق

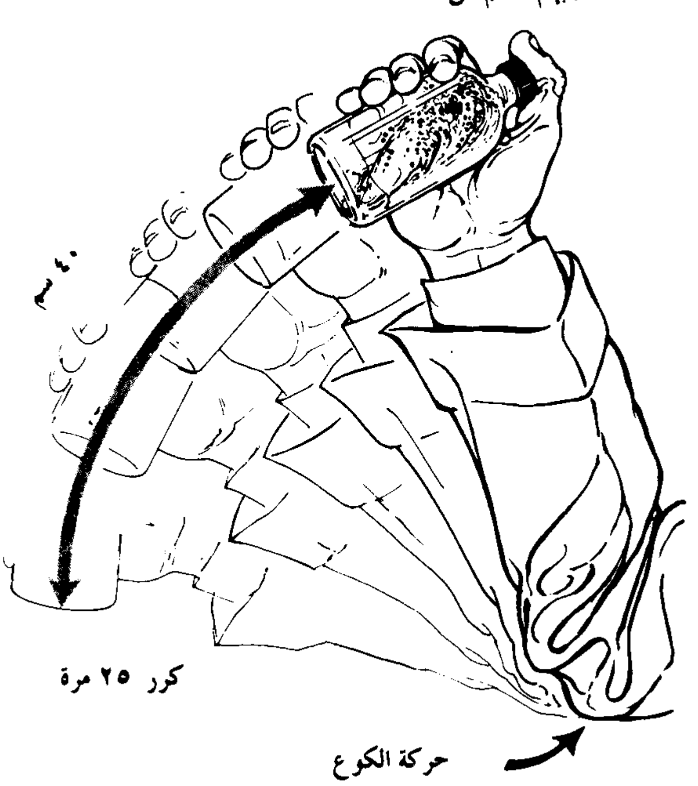
PROCEDURE　طريقة العمل

١ – اصهر خمس أنابيب آجار مغذى (بكل ١٥ مل) . برّد الأنابيب إلى ٤٥° م واتركها معدة للاستعمال عند عمل التخفيفات ، مراعيا ألّا يمر أكثر من دقائق قليلة بين وقت وضع العينة بأطباق بترى وخلط العينة بالآجار .

٢ – بماصة معقمة .. خذ ١,١ مل من العينة أ ، وضع ٠,١ مل فى طبق بترى المعقم (انظر شكل ٢ – تدريب ١٥) ، وضع الباق من الماصة (١ مل) فى طبق بترى آخر معقم . اكتب على الطبق الأول أ – ١٠^-١ ، وعلى الطبق الثانى أ – ١ .

٣ – لا يمكن وضع العينة ب المحتوية على أعداد كبيرة من البكتيريا مباشرة فى الأطباق كما حدث فى عينة أ ، بل يجب أن تخفف بماصة معقمة ، خذ ١ مل من العينة ب وضعها فى زجاجة التخفيف الأولى ، المحتوية على ٩٩ مل من محلول التخفيف المعقم . هذه الزجاجة تحتوى الآن على ١ مل من العينة الأصلية مخفف ١٠٠ مرة ، وعلى ذلك فإن ١ مل من هذا التخفيف يعادل ٠١, مل من العينة الأصلية .

٤ – رج الزجاجة جيدًا ٢٥ مرة ، محركا ساعد اليد فى شكل قوس طوله حوالى ٤٠ سم ، وذلك للتأكد من المزج الجيد المنتظم التوزيع للعينة ، وأيضا لتفتيت البكتيريا التى قد تكون متجمعة فى كتل (انظر شكل ٦) .



شكل (٦) : مزج العينة .

٥ – بماصة أخرى معقمة .. خذ ١,١ مل من زجاجة التخفيف الأولى (تخفيف ١٠⁻²) ، ضع ٠,١ فى طبق بترى معقم (تخفيف ١٠⁻³ من العينة الأصلية) ، اكتب على الطبق ب – ١٠⁻³ . ضع الباقى من الماصة (١ مل) فى طبق بترى آخر معقم (تخفيف ١٠⁻² من العينة الأصلية) واكتب عليه ب – ١٠⁻² .

٦ – بنفس الماصة .. خذ ١ مل من زجاجة تخفيف ١٠⁻² ، وانقله إلى زجاجة التخفيف الثانية المحتوية على ٩٩ مل من محلول التخفيف المعقم . رج الزجاجة جيدًا ٢٥ مرة كما سبق ، وانقل ١ مل من هذه الزجاجة إلى طبق بترى . اكتب على الطبق ب – ١٠⁻⁴ .

٧ – صب الآجار المنصهر المبرد بالأطباق ، امزج العينة جيدًا بالآجار ، وذلك بإمالة الطبق يميناً ويسارًا عدة مرات ، أو بتحريك الطبق برفق حركة دائرية منتظمة عدة مرات ، مراعيا عدم سكب الآجار على حافة الطبق .

٨ – ضع أطباق بترى على سطح مستوى ، وبعد أن تبرد ، ضعها فى الحاضن مقلوبة على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٩ – عد المستعمرات النامية بكل طبق يحتوى على عدد مستعمرات يترواح ما بين ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة .

لعد المستعمرات وحساب أعداد البكتيريا بالأطباق ، راجع الجزء الخاص بذلك المذكور بالأطباق المنتشرة .

QUESTIONS

أسـئلة

١ – لماذا نجرى العد بالأطباق المحتوية على ٢٠ – ٢٠٠ مستعمرة فى حالة استخدام طريقة الأطباق المنتشرة ، بينما نعد الأطباق المحتوية على ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة فى طريقة الأطباق المصبوبة ؟

٢ – هل تميل المستعمرات لأن تتكون من تجمعات الخلايا بدرجة أكبر من تلك التى تتكون من خلايا منفردة ؟

ما هو المقصود بمصطلح : الوحدة المكونة للمستعمرة (Colony-Forming Unit, CFU) ؟

٣ – لماذا يجب تغيير الماصات بين التخفيفات ؟

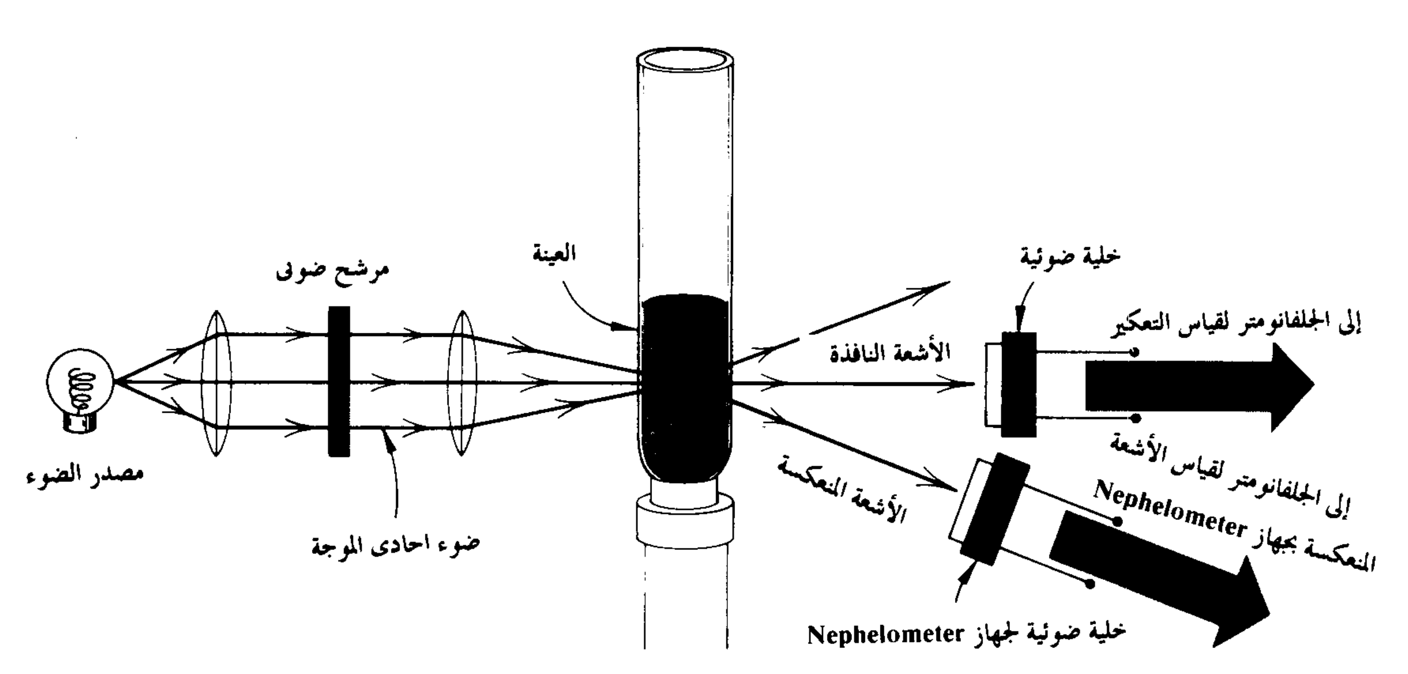
تدريب (١٦)

تقدير النمو البكتيرى بالتعكير

Turbidimetric Estimation of Bacterial Growth

تعمل المزرعة البكتيرية كمعلق غروى ، يحجب ويعكس الضوء المار خلالها . وفى حدود معينة .. فإن الضوء الذى يمتص absorbed ، أو ينعكس reflected بواسطة معلق الخلايا ، يتناسب طرديا مع تركيز الخلايا بالمزرعة . وعلى ذلك .. فإن باستعمال جهاز Nephelometer لقياس الأشعة الضوئية المنعكسة ، أو جهاز قياس التعكير Turbidimeter لقياس نسبة الأشعة الممتصة ، فإنه يمكن تقدير عدد الخلايا الموجودة بالمعلق البكتيرى .

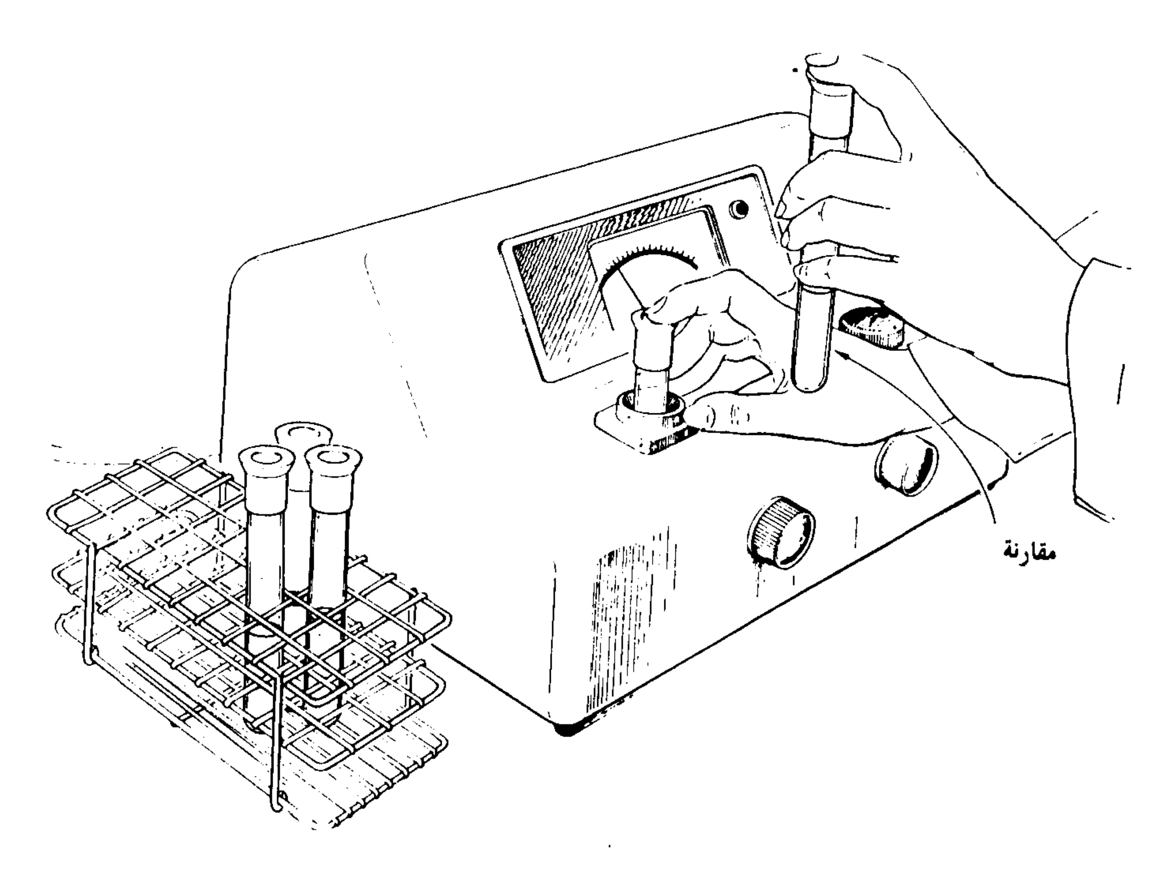
يستعمل فى هذه التقديرات جهاز قياس الألوان الضوئى photocolorimeter . يعتبر هذا الجهاز مصدر الضوء الأحادى الطول الموجى single wavelength ، وهذا يعتمد عادة على وجود مرشح ضوئى يسمح فقط بنفاذ الطول الموجى المرغوب من الضوء ، ويمر الضوء النافذ من المرشح خلال المزرعة البكتيرية . تقاس كمية الضوء المنعكس reflected ، أو النافذ transmitted من المزرعة ، بواسطة خلية ضوءكهربية متصلة بجلفانومتر (انظر شكل ١) . وعموما .. تتم معظم تقديرات النمو البكتيرى باستخدام جهاز قياس الألوان الضوئى كجهاز لقياس التعكير Turbidimeter ، ونادرًا ما يستخدم كجهاز Nephelometer لقياس الأشعة المنعكسة .



شكل (١) : رسم تخطيطى لجهاز قياس الألوان الضوئى الذى يمكن أن يستعمل كجهاز لقياس التعكير أو كجهاز لقياس الأشعة المنعكسة .

فى طرق قياس التعكير .. يمكن أن يُعبر عن قدرة المزرعة على حجب الضوء بنسبة الضوء النافذ . وفى حدود معينة .. فإن هذه النسبة تتناسب عكسيًّا مع تركيز الخلايا بالمزرعة . وعادة .. فإنه من الأفضل أن يعبر عن التعكير كإمتصاص (أ) (Absorbance) ، وهذا يتناسب طرديا مع تركيز الخلايا بالمزرعة (انظر شكل ٢) . الامتصاص (أ) هو : اللوغاريتم السالب لنسبة النفاذية (— لو ج) ويعبر عنه بـ ٢ – لوج ، بمعنى أن الامتصاص أ = لو ١٠٠ — لو ج ، حيث ج قراءة الجلفانومتر .

عند استخدام طرق التعكير لقياس النمو البكتيرى .. فإن درجة تعكير المزرعة البكتيرية ترتبط بتقديرات أخرى معلومة للنمو البكتيرى مثل : العدد الكلى للبكتيريا المقدر بطريقة العد بالأطباق . لذلك .. فإنه يعمل منحنى قياسى standard curve يوضح العلاقة بين الامتصاص وعدد خلايا البكتيريا ، ويمكن أن يستخدم هذا المنحنى لتقدير عدد البكتيريا الموجودة فى معلق ما . ولهذه الطريقة فوائد تطبيقية عديدة ، يتضمن ذلك استخدامها فى المعامل الإكلينيكية لعمل لقاح قياسى لتقدير حساسية المضادات الحيوية بطريقة كيربى – باور Kirby - Bauer method المشروحة فى تدريب (٧٧) .



شكل (٢) : قراءة الضوء الممتص لمزرعة فى جهاز قياس التعكير .

PROCEDURE طريقة العمل

١ – باستعمال الطريقة الموضحة بتدريب ١٥ ، أجر عدًّا بطريقة الأطباق لمزرعة من بكتيريا *Escherichia coli* مستعملا تخفيفات ١٠$^{-٦}$ ، ١٠$^{-٧}$ ، ١٠$^{-٨}$ من المزرعة ، حضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٢ – ستزود بخمس أنابيب ، كل منها يحتوى على ٥ مل من بويون مغذى معقم ، استعمل أربع أنابيب لعمل أربعة تخفيفات متسلسلة (١ : ٢) من المزرعة :

(أ) انقل ٥ مل من المزرعة إلى أحد أنابيب البيئة السائلة (أنبوبة التخفيف الأولى) . اخلط جيدًا .

(ب) انقل ٥ مل من أنبوبة التخفيف الأولى إلى أنبوبة البيئة السائلة الثانية . اخلط جيدًا .

(جـ) انقل ٥ مل من أنبوبة التخفيف الثانية إلى أنبوبة البيئة السائلة الثالثة . بعد الخلط انقل ٥ مل من أنبوبة التخفيف الثالثة إلى أنبوبة البيئة الرابعة لتحصل على التخفيف النهائى . حضن الأربع أنابيب على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٣ – استعمل جهاز قياس الألوان الضوئى حسب ما ستزود به من تعليمات من مشرف الدرس العملى .

ضع بالجهاز الأنبوبة الخامسة المحتوية على البيئة السائلة المعقمة (غير ملقحة) ، اضبط الجلفانومتر ليقرأ ١٠٠٪ نفاذية – بعد ذلك قدر الامتصاص الضوئى لمزرعة *E-coli* غير المخففة (الأصلية) التى عمرها ٤٨ ساعة ، وقدر كذلك الامتصاص الضوئى لأربع أنابيب المزرعة المخففة . دوّن قراءة الكثافة الضوئية Optical density لكل أنبوبة .

٤ – بعد إجراء العد لهذه المزارع بواسطة الأطباق ، ارسم رسما بيانيًّا موضحًا عليه الامتصاص الضوئى للتخفيفات المختلفة على الإحداثى الرأسى ، وما يقابل ذلك من أعداد فعلية للبكتيريا على الإحداثى الأفقى ، وذلك على صفحة التقرير الخاصة .

QUESTIONS أسـئلة

١ – لماذا يضبط الجلفانومتر عند ١٠٠٪ نفاذية بالنسبة لعينة البيئة السائلة غير الملقحة ؟

٢ – من أين جاء الاستنتاج الخاص بأن مقياس الامتصاص = ٢ – لوج ؟ ولماذا ليس – لوج ؟

٣ – ستصبح قادرا على استخدام طريقة التعكير لتقدير النمو البكتيرى فى التجارب القادمة .

باستخدام الرسم البيانى الناتج من التدريب الحالى ، والذى يربط بين الامتصاص الضوئى ، وعدد الخلايا ، سيمكنك تقدير عدد خلايا *E-coli* فى التجارب القادمة .

لماذا لا تستطيع استعمال نفس الرسم البيانى (أو المنحنى القياسى) مع البكتيريا الأخرى ؟

٤ – ليس من المعتاد استخدام طرق التعكير لتقدير النمو الفطرى ، لماذا ؟

تـدريـــب (١٧)

منحنى النمو
Growth Curve

النمو الميكروبى عبارة عن زيادة متدرجة بنظام معين فى المحتويات الخلوية التى تنتهى عادة بانقسام الخلية . تحت الظروف المثلى .. نجد أن النمو زيادة متدرجة ، أو تضاعف لكل المحتويات الخلوية ، ويطلق عليه النمو المتوازن Balanced growth .

تحت الظروف العادية .. يتبع النمو سلوكا يمكن التنبؤ به . بالتلقيح فى بيئة حديثة التحضير .. تمر المزرعة فى طور ركود Lag phase فى زيادة عدد الخلايا – خلال هذه الفترة .. تزداد الخلايا فى الحجم وتؤقلم قدراتها فى التمثيل الغذائى (أى تمثيل DNA ، RNA ، البروتين) للوصول إلى النمو الأمثل . تتبع هذا الطور فترة من النمو اللوغاريتمى Exponential growth تكون المزرعة خلالها فى نمو متوازن ، ويكون معدل النمو ثابتا . بمضى الوقت .. تستهلك المزرعة المواد الغذائية الأساسية التى بالوسط ، ويزداد تجمع نواتج التمثيل السامة ، مما يؤدى إلى بطء معدل النمو . وبازدياد ظروف الوسط سوءا .. تقف الزيادة فى عدد الخلايا ، وبمرور الوقت فإن الخلايا تبدأ فى الموت .

يمكن تتبع النمو بالمزرعة الميكروبية بقياس التغيرات التى تحدث فى كتلة الخلايا ، أو عدد الخلايا الحية ، أو أى مكون كيميائى بالخلية (مثل : RNA ، أو البروتين) .

فى التدريب الحالى ستتتبع النمو فى مزرعة ميكروبية بطريقتين : بتقدير كتلة الخلايا ، وبعد الخلايا الحية ، وهذا سيعطيك الفرصة لمقارنة العلاقة بين الطريقتين .

البكتريا المستخدمة فى هذا التدريب هى *Beneckea natriegens* ، وهى سالبة لجرام ، عصوية ، تنتمى إلى مجموعة السيدومونادات . وتعتبر هذه البكتيريا نموذجية لهذا التدريب بسبب معدل نموها السريع . هذه البكتيريا محبة للملوحة إجباريًا ؛ لذلك فإن كل البيئات ومحاليل التخفيف المستعملة ستزود بـ ١,٥٪ كلوريد صوديوم .

PROCEDURE طريقة العمل

لإجراء هذا التدريب .. فإنك ستشترك مع زميل لك فى العمل .

احقن أنبوبة بها بيئة مرق منقوع المخ ، والكبد Brain-heart infusion broth المحتوى على ١,٥٪ كلوريد صوديوم ، ببكتيريا *B-natriegens* (سيوضح لك مشرف الدرس العملى حجم اللقاح المناسب للاستعمال) .

١ – بسرعة عقب التلقيح .. اقرأ الامتصاص الضوئى لأنبوبة المزرعة عند ٦٥٠ نانومتر مستعملا الفوتومتر ، أو الإسبكتروفوتومتر . دوّن القراءة .

عقب أخذ القراءة .. حضن المزرعة بسرعة على الحاضن الهزاز على درجة ٣٧° م .

٢ – استمر فى أخذ قراءات الامتصاص الضوئى كل ١٥ دقيقة حتى تلاحظ عدم حدوث زيادة فى قراءة الامتصاص .

عقب كل قراءة .. اعد ثانية تحضين المزرعة . نظرا لأن الاختلافات فى درجة الحرارة قد تؤثر تأثيرا سيئًا على نمو البكتيريا ؛ لذا يجب أن يكون قطع تحضين المزرعة لأقصر فترة ممكنة .

٣ – لعد الخلايا الحية .. ابدأ بعمل الأطباق عندما يزيد الامتصاص الضوئى للمزرعة عن ٠,١ – طريقة العد بالأطباق تكون كالآتى :

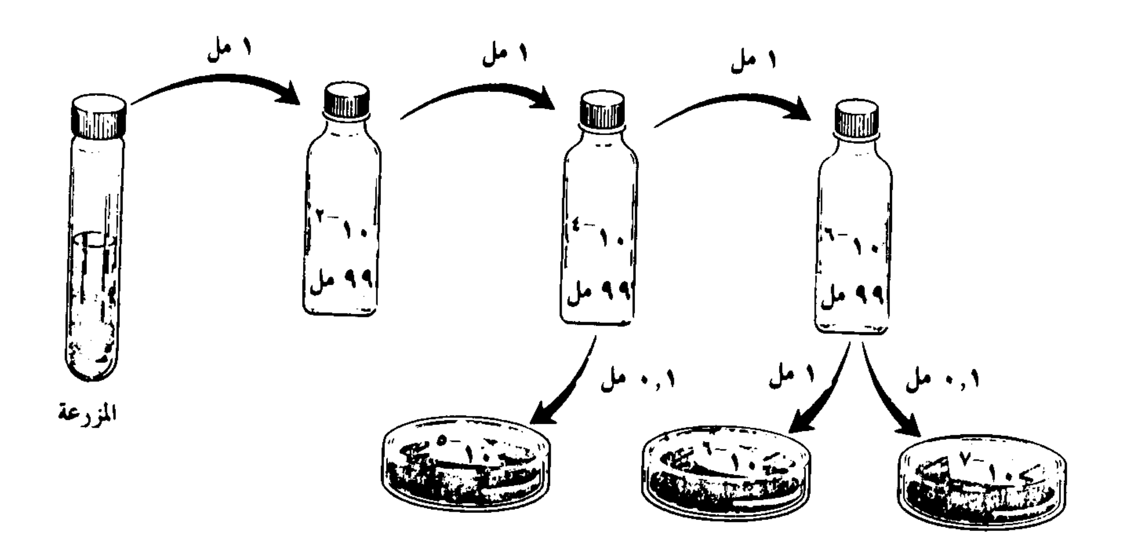
(أ) بسرعة عقب قراءة امتصاص المزرعة .. انقل ١ مل من المزرعة إلى زجاجة تخفيف ٩٩ مل – اخلط جيدا .

(ب) استمر فى عمل تخفيفات (١ : ١٠٠) حتى ١٠^-٦ . ضع بالأطباق تخفيفات من ١٠^-٥ ، ١٠^-٦ ، ١٠^-٧ مع استعمال بيئة الآجار المغذى المزودة بـ ١,٥٪ كلوريد صوديوم (شكل ١) .

٤ – كرر طريقة عمل الأطباق السابقة للعد كل ٣٠ دقيقة مستعملا طريقة التخفيف المذكورة أعلاه .

٥ – حضن كل الأطباق على درجة ٣٧° م وبعد مضى ٢٤ ساعة ، اجر العد لكل العينات .

٦ – باستعمال ورق نصف لوغاريتمى ، ارسم رسما بيانيا يوقع على الإحداثى الرأسى قراءات الامتصاص الضوئى ، وعدد الخلايا الحية لكل ١ مل ، وعلى الإحداثى الأفقى الوقت بالدقيقة .



شكل (١) : طريقة التخفيف لقياس منحنى النمو .

هل أظهر الرسم البيانى أطوار الركود ، والنمو اللوغاريتمى ، والطور الثابت ؟

بيّن على رسمك البيانى الأطوار التقريبية للنمو ؟

فيم يختلف رسمك البيانى للامتصاص عن عدد الخلايا الحية ؟ اشرح ؟

٧ – من رسمك البيانى الذى يربط بين عدد الخلايا الحية / مل والزمن ، احسب متوسط عمر الجيل لبكتيريا ***Beneckea*** خلال الطور اللوغاريتمى للنمو .

QUESTIONS

أسـئلة

١ – عند تتبعك للنمو ، لماذا توقع على الرسم الامتصاص بدلا من نسبة النفاذية ؟

٢ – كيف تحسب متوسط عمر الجيل من المعلومات الخاصة بالامتصاص الضوئى ؟

الباب السادس

المؤثرات البيئية

ENIVIRONMENTAL INFLUENCES

تتأثر الميكروبات ، مثل غيرها من صور الحياة ، بالوسط المحيط . وتقع المؤثرات البيئية فى ثلاثة أقسام : الفيزيائية مثل : الحرارة ، والضغط العالى ، والكيميائية مثل : الحاجة للغذاء ، والاستجابة لأثر السموم ، والبيولوجية (وهى بالضرورة مؤثرات كيميائية) مثل : تأثير أنواع الكائنات المحيطة .

وتوجد لكل نوع ميكروبى مجموعة من الظروف المثلى ، كما توجد لكل نوع نباتى ، أو حيوانى . ولكن المملكة الميكروبية تتميز بوجود مدى واسع لمقاومة الظروف ، يميزها عن غيرها من صور الحياة . فالجسم البشرى - مثالاً على ذلك - له درجة حرارة اعتيادية شديدة الانضباط عند ٣٧° مئوية (أو ٩٨,٦° فهرنهيت) ، وهذه لابد أن تبقى ثابتة بصرف النظر عن التعرض للحرارة ، أو البرد الشديدين . أما الخلية البكتيرية فليس لها درجة حرارة ثابتة منضبطة ، ولكنها تكتسب حرارة الوسط المحيط بها ، أما استجابتها للتعرض الطويل للبرودة ، أو الجفاف الشديد فتظهر فى مجرد توقف النشاط الإنزيمى ، وليست من الضرورى أن تموت مثل ما يحدث لصور الحياة على الأرض .

وبالرغم من أن الغالبية العظمى للميكروبات تحتاج إلى نفس الظروف المناسبة لأغلب الخلايا النباتية ، والحيوانية .. إلا أننا نجد « الشواذ » بين الميكروبات التى تستطيع أن تعيش (أو حتى تتطلب لحياتها) ظروفا تعتبر خارج حدود مقاييسنا العادية (الاعتيادية) . كما أن الوسط المحيط يعمل على انتخاب الخلايا المختلفة - من بين الخلايا المكونة للمجتمع الميكروبى الكبير - التى تستطيع أن تعيش فى الظروف التى يتعرض لها هذا المجتمع . ومع ذلك .. فإن الميكروبات لا تستطيع أن تتجاور مع اثنين من أعداء كل أنواع الحياة وهما : الحرارة الشديدة ، وبعض السموم الكيميائية ؛ فكل من هذين العاملين يؤثران على إنزيمات محددة ، أو على بعض مكونات الخلية الهامة التى بدونها تتوقف الحياة .

وتوضح سلسلة التجارب فى هذا الباب استجابة مختلف الصور الميكروبية لمختلف المؤثرات البيئية . وفى نضالنا المستمر للتحكم فى الميكروبات الضارة ، والنافعة .. فإن أقوى وسائلنا لهذا هو

التحكم فى الوسط المحيط بالميكروب . فلحفظ مختلف المواد .. استخدم الانسان الحرارة والضغط الأسموزى ، والتخلص من الأكسجين ، وذلك للتأثير على النمو الميكروبى . وكما هو متوقع .. فإن القدرة العالية للميكروبات على التأقلم والتنوع تجعل التحكم فى الميكروبات أمرًا صعبا .

تدريب (١٨)

تأثير الحرارة على النمو Effect of Temperature on Growth

لمختلف الأنواع الميكروبية احتياجات حرارية محددة لنموها . وفيما بين درجة الحرارة القصوى Maximum - والتى فوقها لا تنمو المزرعة - ، ودرجة الحرارة الدنيا Minimum ، والتى دونها لاتنمو المزرعة ، يوجد المدى الحرارى الذى يحدث داخله النمو . ولكن أقصى نمو يحدث فى مدى محدد يكون عند درجة حرارة تسمى درجة الحرارة المثلى Optimum للنمو . وترتبط الدرجة المثلى لنمو نوع ميكروبى بدرجة حرارة الوسط الطبيعى لنمو هذا النوع . ومثالاً على ذلك .. فإن الدرجة المثلى لنمو ميكروب ، مسبب للمرض لحيوان من ذوى الدم الحار ، تقترب من درجة حرارة الدم ، وهى ٣٧°م .

وفى الحقيقة .. يعتبر تأثير الحرارة على النمو مقياسًا لتأثير الحرارة على النشاط الإنزيمى فى الخلية (انظر شكل ١) . ومع انخفاض الحرارة .. ينخفض النشاط الإنزيمى و نمو الخلية بالتالى . وعند درجة التجمد .. يتوقف النشاط الأيضى تماما ليس فقط نتيجة للإيقاف المباشر للنشاط الإنزيمى ، ولكن أيضًا لعدم قدرة الخلية على الحصول على الماء ، وهو ضرورى لامتصاص العناصر ، وللتخلص من الفضلات . أما عند ارتفاع الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو .. فإن النشاط الأيضى يزداد ، ولكن فى نفس الوقت يزداد بوضوح معدل تحطيم الإنزيمات ، والبروتينات (نتيجة للتغير الحرارى للبروتين) ، مما يؤدى إلى الإضرار بالخلايا وموتها .

طريقة العمل PROCEDURE

معك ٢٠ أنبوبة مرق الجلوكوز

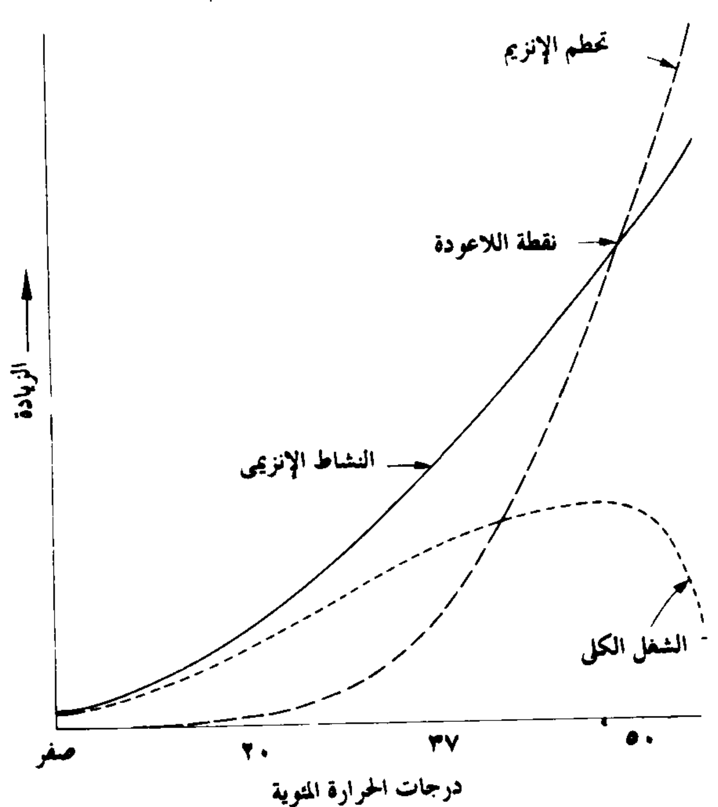
١ - لقح مجموعة من ٥ أنابيب ، لكل من المزارع التالية :

Escherichia coli, Bacillus stearothermophilus,
Pseudomonas fluorescens, Micrococcus luteus.

٢ - حضن أنبوبة من كل مزرعة عند درجة من درجات الحرارة التالية : ٥ ، ٢٠ ، ٣٥ ،

٤٥ ، ٥٥° م على أن يتم التحضين فى خلال ٥ دقائق من تلقيح الأنابيب . أما المزارع التى يتم تحضينها عند ٤٠° م ، أو أكثر .. فلابد من تحضينها بمحضنات خاصة جيدة التصميم ، أو فى حمامات مائية لتجنب التذبذب فى درجة الحرارة .

٣ - يتم ملاحظة النمو فى الأنابيب بعد يومين وسبعة أيام .

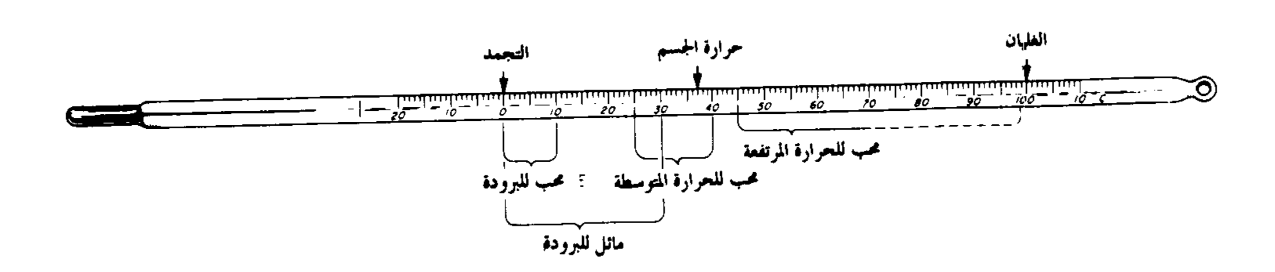


شكل (١) : العلاقة بين درجة الحرارة ، وتحطيم الإنزيمات فى الخلايا المحبة للحرارة المتوسطة .

أســـئلة QUESTIONS

١ - ما هو الميكروب المقاوم للحرارة ؟ ، والميكروب المحب للبرودة ؟ (انظر شكل ٢) ؟

٢ - من أى المصادر الطبيعية يمكنك عزل ميكروب محب للحرارة ، وميكروب محب للبرودة ؟



شكل (٢) : طريقة التنشيط الضوئى بعد المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية

تدريـــب (١٩)

مقاومة الميكروبات للحرارة
Heat Resistance of Microbes

تكون الخمائر والفطريات وبعض أنواع البكتيريا جراثيم . والوظيفة الأساسية لجراثيم كل من : الخمائر ، والفطريات هى : التكاثر ، حيث تكوّن خلية الخميرة ، أو الفطر عددًا قليلاً ، أو كبيرًا من الجراثيم . وعلى العكس من ذلك .. فلا تكوّن خلية البكتيريا إلا جرثومة واحدة . والجرثومة الداخلية فى البكتيريا شديدة المقاومة للحرارة .. بينما لا تتميز جراثيم الخمائر ، والفطريات بهذه الميزة . وسوف تقوم فى هذه التجربة بمقارنة المقاومة الحرارية لمختلف أنواع الجراثيم الميكروبية ، والخلايا الخضرية .

طريقة العمل
PROCEDURE

١ – أمامك زوج من أنابيب مزارع سائلة لكل من :

Bacillus cereus, Escherichia coli, Aspergillus niger, Saccharomyces cerevisiae

كما توجد أيضًا أنبوبتان من المرق المعقم ، لقح هاتين الأنبوبتين بقليل من التربة .

٢ – اغمر أنبوبة من كل مجموعة فى حمام ماء ساخن مضبوطة حرارته بدقة عند٨٠°م ،وذلك لمدة ١٠ دقائق ، مع التأكد من أن مستوى الماء الساخن فوق مستوى سطح محتوى الأنابيب . وبعد انتهاء مدة الغمر فى الماء الساخن .. برد الأنابيب بسرعة فى ماء بارد ، ثم حضن أنابيب المرق التى تعرضت ، والتى لم تتعرض للمعاملة الحرارية عند درجة حرارة الغرفة حتى الدرس العملى التالى .

٣ – بعد انتهاء فترة التحضين .. لقح أنابيب آجار جلوكوز مائلة من هذه الأنابيب ، ثم حضن على درجة حرارة الغرفة لمدة ٤ أيام ولاحظ النمو فى هذه الأنابيب .

٤ – تعمل شرائح بكل من صبغة جرام ، وبصغة الجراثيم من أنابيب الآجار المائل التى لقحت من المزارع التى تعرضت للمعاملة الحرارية ، ويتم فحص النمو .

أســـئلة
QUESTIONS

١ – ماذا تستنتج من دراستك للمقاومة الحرارية للخلايا الخضرية ، ومختلف أنواع الجراثيم ؟

٢ – ما هى مميزات الجراثيم الداخلية التى ترتبط بمقاومتها الحرارية ؟

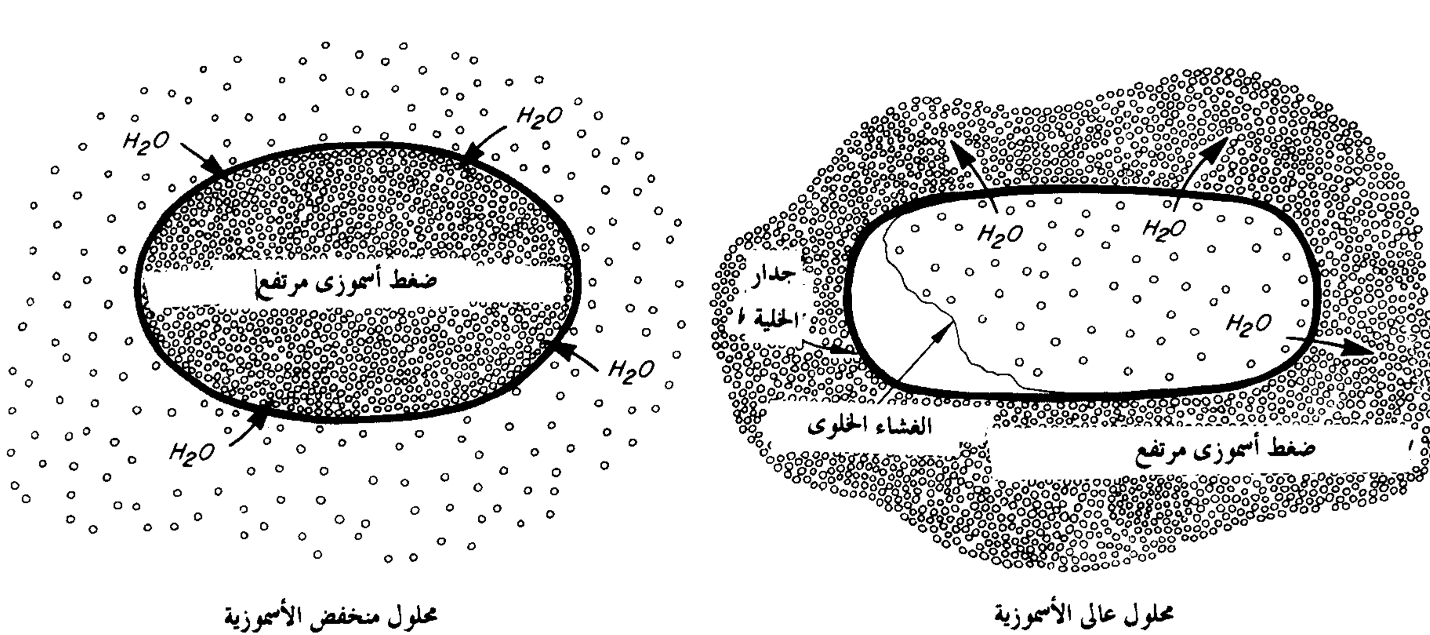
٣ - هل يعتبر فشل المزرعة بعد المعاملة الحرارية ، فى النمو على أنابيب آجار الجلوكوز المائل ، دليلاً كافيا على أن جراثيم الخمائر ، والفطريات لم تتحمل هذه المعاملة ؟

تـدريـــب (٢٠)

تأثير الضغط الأسموزى على النمو Effect of Osmotic Pressure on Growth

لكل من الخلايا البكتيرية ، والمنبت الغذائى المحيط بها ، تركيز أسموزى منفصل يعتمد على تركيز المواد الذائبة فى كل منهما . وعند وضع الخلية البكتيرية فى بيئة .. يتكون ضغط أسموزى خلال الغشاء شبه المنفذ الذى يحيط بالخلية .

وعلى العموم .. فإن الميكروب ينمو أحسن ما يمكن فى البيئة التى لها تركيز أسموزى أقل قليلا من تركيز الخلية نفسها ، حيث يؤدى هذا إلى انتقال الماء إلى داخل الخلية ، وهذا ضرورى لدخول المواد الغذائية وللمحافظة على انتفاخها (turgor) . وعندما يكون التركيز الأسموزى للبيئة أقل كثيرًا من تركيز الخلية (منخفض الأسموزية hypotonic) .. فإن انتقال الماء إلى داخل الخلية سيكون عاليًا ؛ مما يزيد من انتفاخ الخلية . وعلى ذلك فإن الخلايا التى ليس لها جدار خلوى صلب ، مثل خلايا كرات الدم الحمراء ، سوف تنفجر فى مثل هذه البيئة . ويطلق على هذه الظاهرة ا سم الانتفاخ الأسموزى (Plasmoptysis) . وعلى العكس .. إذا كان الضغط الأسموزى للبيئة أعلى مما هو فى الخلايا ؛ فإن البيئة تسمى مرتفعة الأسموزية (hypertonic) بالنسبة للخلية . وفى البيئة المرتفعة الأسموزية .. فإن الماء يخرج من الخلية ، وبالتالى ينكمش الغشاء السيتوبلازمى عن الجدار الخلوى الصلب ، وتسمى هذه الظاهرة الانكماش الأسموزى Plasmolysis (انظر شكل (١)) .



شكل (١) : العلاقة بين الضغط الأسموزى للبيئة وحركة الماء إلى داخل وخارج الخلية .

يجرى هذا التدريب لبيان اختلاف الأنواع الميكروبية فى استجابتها للضغوط الأسموزية العالية فى الأوساط المختلفة ، وكيف يستخدم التأثير المثبط للتركيزات المرتفعة الأسموزية فى حفظ الغذاء .

PROCEDURE طريقة العمل

١ – أمامك أربع أنابيب آجار الجلوكوز العميق ، محتوية على تركيزات مختلفة من ملح الطعام NaCl (٥, ، ٥,٠ ، ١٥,٠ ، ٢٥٪) ، وأربع أنابيب محتوية على تركيزات مختلفة من السكروز ٠,٥٪ ، ١٥٪ ، ٣٠٪ ، ٦٠٪ . جهز طبق آجار من كل أنبوبة آجار . واكتب البيانات على كل طبق موضحًا التركيز ، وهل يحتوى على ملح طعام ، أو السكروز . وباستخدام قلم شمع .. قسم كل طبق من الخلف إلى أربعة أقسام . وباستخدام إبره التلقيح ذات العقدة .. لقح كل قسم فى كل طبق بإحدى المزارع الموجودة أمامك ، وهى : *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Staphylococcus aureus, Penicillium chrysogenum* ، بحيث يكون التلقيح فى منطقة صغيرة حوالى واحد سنتيمتر مربع ، لمنع تداخل النمو للمزارع المختلفة فى الطبق وتزاحمها . اكتب على كل جزء اسم المزرعة الخاصة به . حضن الأطباق على ٣٠°م ولاحظ النمو بعد يومين ، وسبعة أيام .

٢ – أمامك أيضًا أربع أنابيب مرق جلوكوز ، تحتوى على تركيزات مختلفة من NaCl (٥, ، ٥ ، ١٥ ، ٢٥٪) ، وأربعة أنابيب أخرى من مرق الجلوكوز تحتوى على تركيزات مختلفة من السكروز (٥, ، ١٥ ، ٣٠ ، ٦٠٪) . لقح كل أنبوبة من أنابيب المرق المحتوى على NaCl بقطعة من الهامبرجر الخام ، وكل أنبوبة من مرق السكروز بقطعة من الفاكهة الجافة (مثل : الزبيب) . حضن الأنابيب على ٣٠°م ولاحظ النمو بعد يومين ، وسبعة أيام .

تتميز أغلب أنواع البكتيريا بحساسيتها للضغط الأسموزى المرتفع بعكس الخمائر ، والفطريات الأكثر مقاومة للأوساط العالية الأسموزية . ومع هذا .. يلاحظ فى الطبيعة وجود صور ميكروبية من بينها أنواع من البكتيريا تعيش فى أوساط لها ضغط أسموزى مرتفع . فإذا ما تم عزل البكتيريا من البحيرات المالحة الطبيعية ، نجد أن من بينها أنواعًا تقاوم التركيزات العالية من الملح ، بل أن بعضها يحتاج إلى تركيزات عالية من الملح لنموه الأمثل . ويطلق على الميكروب الذى ينمو فى ضغوط أسموزية مرتفعة ، أو ملوحة عالية ، الاصطلاح محب للأسموزية Osmophilic ، أو محب للملوحة Halophilic . أما الميكروبات التى تعيش ، ولكن لا تنمو فى مثل هذه الظروف فتسمى متحملة للملوحة salt-tolerant . وتأثير الضغط الأسموزى ، والذى يعتبر أساسًا تأثيرا مجففا ، له أهمية عملية كبيرة فى بكتريولوجيا الأغذية ؛ إذ إن حفظ بعض الأغذية (المربى ، الكرنب المخلل ، الحليب المكثف ، اللحوم والأسماك المملحة) يعزى جزئيا أو كليا إلى الضغط الأسموزى المرتفع . ويلاحظ أن الحفظ لا

يعنى أن الغذاء معقم ، ولكنه قد يحتوى على كثير من الأحياء التى تستطيع أن تنمو إذا تم خفض الضغط الأسموزى .

QUESTIONS أسـئلة

١ - هل كل الميكروبات المحبة للأسموزية محبة للملوحة ؟ وهل العكس صحيح ؟

٢ - كيف يستطيع ميكروب ما النمو فى وسط مرتفع الأسموزية ؟

تـدريـب (٢١)

تأثير الرقم الأيدروجينى للبيئة على النمو

Effect of pH Meduim on Growth

لأغلب الميكروبات درجة تركيز أيون ايدروجين مثلى لنموها ، وذلك بالرغم من أنها تنمو فى مدى واسع نسبيًّا من الرقم الأيدروجينى . وعموما .. فإن الميكروبات تنمو جيدًا عند الـ pH الخاص بوسطها الطبيعى . ومثالاً على ذلك .. فإن أغلب الميكروبات المتطفلة التى تعيش داخل جسم الإنسان مثل : بكتيريا الالتهاب الرئوى Pneumococci ، يكون نموها الأمثل عند pH قريبًا من تأثير دم الإنسان (pH ٧,٤) .

PROCEDURE طريقة العمل

١ - أمامك أربعة أطباق من آجار الجلوكوز ، لها درجات حموضة مختلفة (pH ٣ ، ٥ ، ٧ ، ٩) ، اكتب رقم الـ pH على كل طبق ، قسم كل طبق من الخلف إلى أربعة أقسام بالقلم الشمع . وبأبرة التلقيح ذات العقدة .. لقح كل قسم لكل طبق بإحدى المزارع التى أمامك :

(Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Penicillium chrysogenm).

بحيث تلقح مساحة صغيرة فى كل حالة ، حوالى واحد سنتيمتر مربع ، لمنع تداخل ، وتزاحم النمو فى الأطباق .

٢ - حضن عند ٣٠°م .

٣ - لاحظ النمو بعد يومين ، وسبعة أيام وسجل النتائج .

يُلاحظ أن الميكروبات ، فى بعض الأطباق ، نتيجة لقيامها بالأيض الغذائى ، تلعب دورًا رئيسيًّا

فى تغيير الرقم الأيدروجينى للوسط ؛ فالبكتيريا المنتجة للحامض ، والفطريات ، والخمائر تزيد من تركيز أيون الهيدروجين فى الوسط ، وتميل للنمو الجيد عند رقم أيدروجينى منخفض نسبيًا . وهناك بكتيريا أخرى ، خصوصا الأنواع التعفنية تحلل البروتين وتنتج آمينات قاعدية وأمونيا . وهذه البكتيريا ترفع الرقم الأيدروجينى فى وسطها وتنمو فى الظروف القلوية .

ولأن الرقم الأيدروجينى يحدد أنواع وصور الميكروبات القادرة على النمو فى ظروف معينة .. فإن لهذا أهمية تطبيقية كبيرة . فمثالاً على ذلك .. يضاف الكبريت للتربة فى بعض الأحوال كطريقة لتثبيط نمو الميكروبات المسببة لمرض جرب البطاطس ، حيث يتحول الكبريت إلى حامض بواسطة بعض بكتيريا التربة مؤديًا إلى خفض الرقم الأيدروجينى ، وهذا يثبط الكائنات المسببة للمرض فى البطاطس .

أسـئلة QUESTIONS

١ – فى أى مدى تقريبى من مقياس الرقم الأيدروجينى – تتم أغلب التفاعلات البيولوجية ؟

٢ – إذا نمى ميكروب ما عند pH-٢,٠ ، فهل تتوقع أن رقم الـ pH داخل الخلية يتناسب مع pH الوسط ؟ لماذا ؟ وكيف يمكنك عمليا تقدير الرقم الأيدروجينى داخل الخلية ؟

٣ – ما هى العلاقة بين الرقم الأيدروجينى ، والحرارة كمؤثرات بيئية ؟

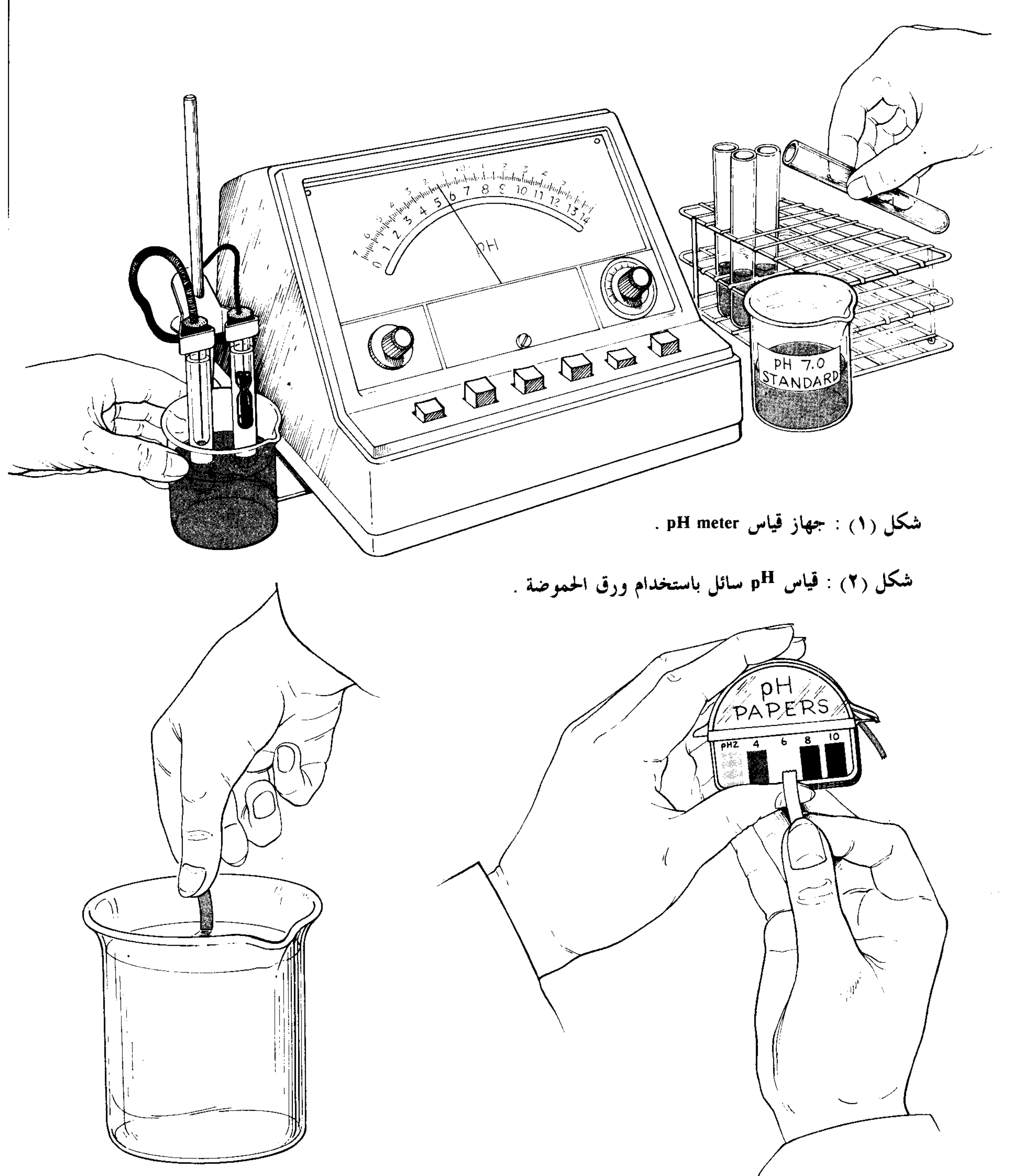
تـدريـــب (٢٢)

تأثير مصدر الطاقة ، والمواد المنظمة للحموضة على النمو

Effect of Energy Source and Buffer on Growth

يعتمد نمو الميكروب فى البيئة الغذائية جزئيا على كمية الطاقة المتاحة . وعندما يهاجم الميكروب المادة الغذائية .. يتراكم عديد من نواتج التفاعل ، ويغير بعضها حموضة الوسط ؛ مما قد يؤثر على النمو . والنواتج النهائية لهدم الكربوهيدرات عادة ما تكوّن أحماضًا عضوية ، وهذه تخفض رقم الأس الأيدروجينى . وعلى العكس من هذا .. فإن أكسدة أملاح الأحماض العضوية ترفع رقم الأس الأيدروجينى . ولمنع التغير السريع فى الرقم الأيدروجينى الذى يثبط النمو .. تضاف مواد منظمة للحموضة (buffers) لبيئة النمو . والمواد المنظمة عبارة عن مواد تمنع التغير فى رقم الأس الأيدروجينى الناتج عن إنتاج الأحماض ، والقلويات . وتتضمن المواد المنظمة المعروفة أملاح الفوسفات ، والكربونات ، وعددًا من المواد العضوية مثل : البروتينات .

سندرس فى هذا التدريب تأثير كمية الجلوكوز على نمو بعض أنواع جنس *Streptococcus* . وهذه البكتيريا الكروية تستخدم الجلوكوز كمصدر أساسى للطاقة ، وتكوّن حامض لاكتيك كناتج نهائى . ولأن عدم منع تراكم هذا الحامض يخفض رقم الأس الأيدروجينى ويحد من استمرار النمو ، فإننا سوف نستخدم الفوسفات كمنظم للحموضة .



شكل (١) : جهاز قياس pH meter .

شكل (٢) : قياس pH سائل باستخدام ورق الحموضة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح البيئات التالية بمزرعة *Streptococcus faecalis* .

(أ) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة .

(ب) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ١٪ جلوكوز .

(جـ) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ١٪ جلوكوز + ٠,٥٪ K_2HPO_4 .

(د) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ٠,١٪ جلوكوز + ٠,٥٪ $K_2H\ PO_4$.

٢ – حضن لمدة يومين عند ٣٧° م .

٣ – رج الأنابيب لتوزيع النمو فيها بانتظام ، ثم قارن النمو (العكارة) بالنظر ، أو قارن كمية النمو باستخدام جهاز قياس التعكير turbidimeter إذا توفر .

٤ – استخدم جهاز قياس الرقم الأيدروجينى ، أو دليل قياس الـ pH الذى أمامك لتقدير رقم الـ pH فى كل أنبوبة (انظر شكلى ١ ، ٢) .

أسئلة QUESTIONS

١ – ما هى المادة التى تستخدم كمصدر للطاقة فى البيئة ؟

٢ – كيف يعمل K_2HPO_4 كمنظم للحموضة ؟

٣ – ما هو التفاعل الذى يؤدى إلى رفع الرقم الأيدروجينى لبيئة النمو ؟

تغذية الميكروبات MICROBIAL NUTRITION

تختلف الاحتياجات الغذائية للميكروبات اختلافا كبيرًا . فالميكروبات ذاتية التغذية (الاوتوتروفية Autotrophic) ومن بينها الميكروبات الممثلة للضوء ، يمكنها أن تنمو وتبنى مكوناتها الخلوية من المركبات غير العضوية فقط . أما الميكروبات غير ذاتية التغذية (الهتيروتروفية heterotrophic) تحتاج إلى واحد أو أكثر من المواد الغذائية العضوية .

ولبعض الميكروبات الهتيروتروفية قدرات تمثيلية كافية لتكوين كل الأحماض الأمينية ، والفيتامينات ، وغيرها من المركبات الضرورية للخلية الحية ، بدءا من مواد بسيطة مثل : أملاح النيتروجين المعدنية بشرط توافر مصدر للكربون ، والطاقة . وهناك أيضًا ميكروبات هتيروتروفية أخرى معقدة الاحتياجات ، ولها احتياجات غذائية تعادل ، أو أكثر تعقيدًا عن احتياجات الكائنات الأرقى . فميكروب *Streptococcus pyogenes* ، مثلاً .. وهو المسبب للحمى القرمزية scarlet fever

والتهاب الحلق ، يحتاج إلى خمسة عشر حامضًا أمينيًا ، بينما يحتاج الإنسان إلى تسعة فقط . وهذه الأمثلة توضح المدى الواسع للاحتياجات الغذائية للميكروبات الهتيروتروفية . عموما .. فإن الأغلبية العظمى للميكروبات التابعة لهذه المجموعة تقع فى وضع وسط ، ولكن فيما بين هذه الحدود المتوسطة توجد اختلافات كبيرة بين الأنواع وبعضها فى احتياجاتها .

تعكس الاختلافات فى الاحتياجات الغذائية بين الميكروبات ، اختلافات فى القدرات التمثيلية ، وهذه يحكمها بالتالى التركيب الوراثى للخلية . والقدرة على استخدام مركب كمصدر للطاقة ، أو استخدام مختلف المواد غير العضوية لبناء البروتين وغيره من مركبات الخلية ، تعتمد على وجود سلسلة من الإنزيمات ، والتى بدونها تزداد الاحتياجات الغذائية للخلية . يتحكم فى تكوين هذه الإنزيمات المادة الوراثية فى الخلية مباشرة . وعدم وجود جين معين مسئول عن تكوين هذه الإنزيمات ، أو تثبيطها ، ينعكس مباشرة فى صورة تغير فى الاحتياجات الغذائية للخلية .

وكثيرا ما يلاحظ أن خلية داخل المجموعة الميكروبية تتغير ، أو تطفر mutate (وهذه الحالة تحدث بنسبة ضئيلة تصل إلى خلية من بين كل مليون خلية) ، والخلية الناتجة عن التغير تفقد القدرة على تكوين فيتامين ، أو حامض أمينى ، أو غيرها من مكونات الخلية الأساسية . ويمثل هذا الفقد فى القدرة التمثيلية تغيرًا فى التركيب الوراثى للخلية . ولا تلاحظ الطفرات التى تفتقد إحدى قدراتها بسهولة داخل المجموعة الميكروبية ، لأنها تستمر فى النمو بشرط توافر المادة ، أو المواد الغذائية المطلوبة لنموها . أما إذا كان وسط النمو يفتقر إلى المادة الغذائية المطلوبة .. فإن الطفرة تعتبر طفرة مميتة ، لأن الخلية التى حدث فيها تغير سوف تعانى جوعا ، بينما يستمر نسل السلالة العادية فى النمو ، والتكاثر . وباستخدام طرق خاصة .. يمكننا عزل الطفرات التى تتطلب لنموها إضافة واحدة أو أكثر من الأحماض الأمينية ، أو الفيتامينات لبيئة النمو التى تنمو فيها . ويطلق على الطفرات التى تتطلب حامضا أمينيًا ، أو مادة غذائية أخرى – لم تكن السلالة الأم تتطلبها – اسم طفرات العوز الغذائى auxotrophs ، أما خلايا السلالة الأم التى لاتحتاج المادة الغذائية فتسمى ابتدائية التغذية prototrophs .

تـدريـــب (٢٣)

التقدير الكمى باستخدام الميكروبات Microbiological Assay

تتضمن الاحتياجات الأساسية للميكروبات المعقدة التغذية ما يلى :

١ – مصدر للطاقة ، ولتكوين بعض مكونات الخلية ، مثل : الكربوهيدرات .

٢ – مصدر لبناء مكونات الخلية والإنزيمات والأحماض النووية مثل : الأحماض الأمينية ، والبيورينات ، والبيريميدينات .

٣ – عوامل نمو ذات أهمية فى التمثيل الغذائى ، وتنظيم التمثيل ، مثل : الفيتامينات .

٤ – أملاح معدنية .

ويرتبط معدل النمو فى حالة البكتيريا المعقدة التغذية فى البيئة ، حتى حد معين ، بتركيز الاحتياجات الغذائية الأساسية ، وهذه تتم إضافتها فى أغلب البيئات بكميات أكبر كثيرا من الكمية المطلوبة . ويؤدى نقص أى منها إلى أن يصبح عاملاً محددًا للنمو . ويعتمد استخدام الميكروبات كوسيلة لتقدير الأحماض الأمينية ، والفيتامينات أساسًا على هذه العلاقة .

وفى التقدير الميكروبيولوجى .. تستخدم بيئة محددة التركيب خالية من المركب المطلوب تقديره . وبإضافة كميات قليلة من هذه المادة الغذائية .. يمكنك مشاهدة استجابة النمو للإضافة بمعدل مرتبط مع تركيز المادة الغذائية . فإذا أردنا دراسة احتواء مادة ما على فيتامين معين .. تتم إضافة كمية معلومة من المادة للبيئة الأساسية (الخالية من الفيتامين المطلوب تقديره) ، ثم يتم تقدير مدى نمو الميكروب المستخدم فى التقدير ، ويتخذ ذلك دليلا على مقدار الفيتامين فى المادة الغذائية .

وفى هذا التدريب سوف تقوم بتلقيح سلالة بكتيرية (ميكروب التقدير assay organism) ، التى تحتاج إلى فيتامين النياسين فى بيئة خالية من النياسين ، وأيضًا فى بيئات أخرى تحتوى على نسبة مختلفة من النياسين .

وبعد التحضين .. يتم تقدير النمو وإنتاج الحامض ، وهما يرتبطان ارتباطًا طرديًّا مع تركيز الفيتامين .

طريقة العمل PROCEDURE

أمامك مزرعة *Lactobacillus plantarum* تحتاج إلى النياسين لنموها ، ونامية على بيئة تحتوى على نياسين (وقد تم فصلها بالطرد المركزى بعد النمو ، ثم غسلت لإزالة أى آثار من النياسين قد تكون ملتصقة بالخلايا) . أمامك أيضا ثمانى أنابيب من بيئة تقدير النياسين تحتوى على تركيزات مختلفة من النياسين : صفر ، ٠,٠٢٥ ، ٠,٠٥ ، ٠,١ ، ١٥, ، ٢, ، ٣, ، ٥, ميكروجرام لكل ١٠ مل فى الأنبوبة .

١ – رقّم هذه الأنابيب من (١ – ٨) ، وباستخدام ماصة تحتوى على معلق خلايا مزرعة *Lactobacillus plantarum* ، وممسوكة رأسيا ضف نقطة واحدة من المزرعة لكل أنبوبة .

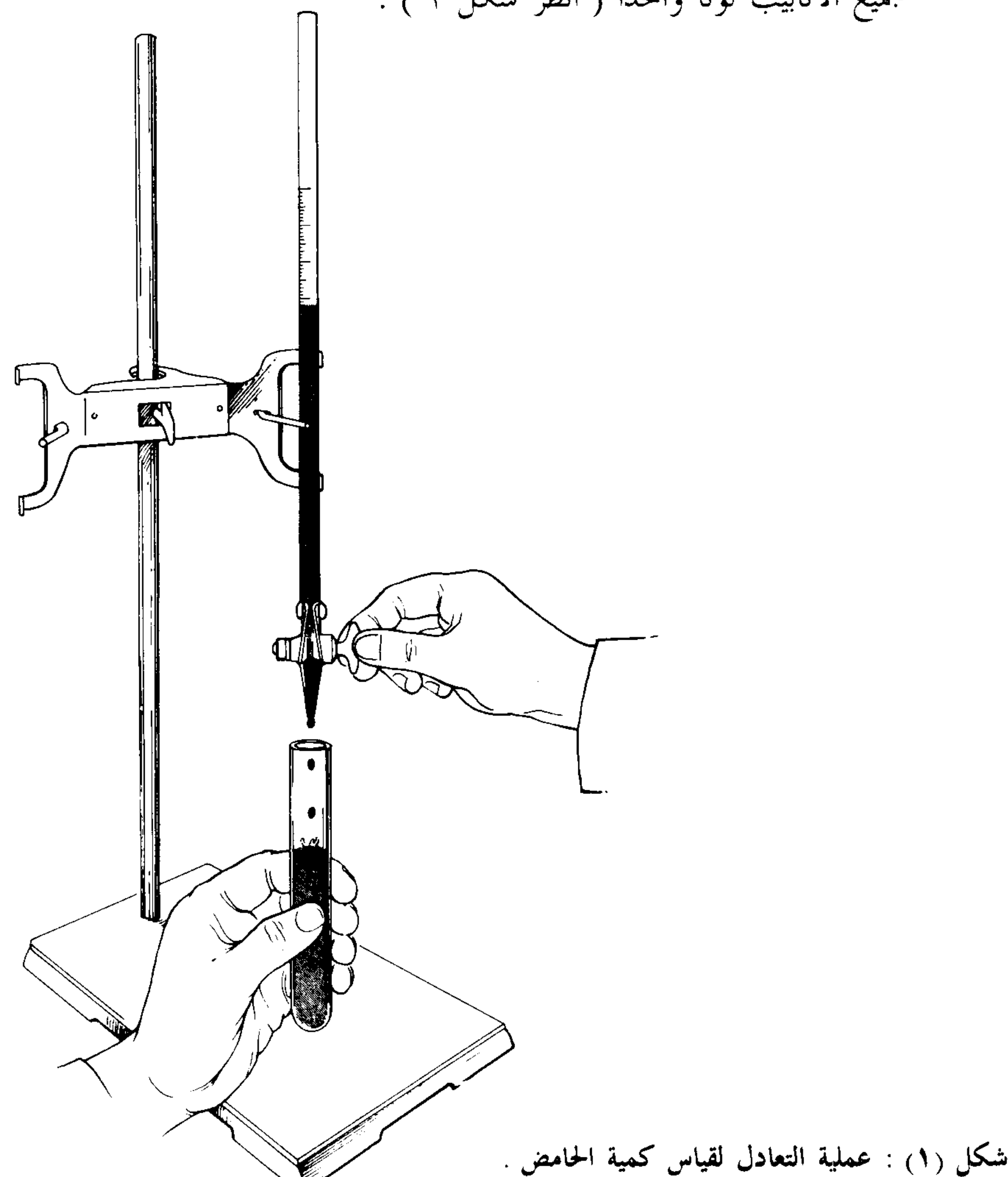
٢ – حضن الأنابيب على ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة .

٣ – باستخدام أنبوبة من بيئة تقدير النياسين غير ملقحة ، اضبط قراءة جهاز قياس الألوان (الإسبكتروفوتومتر) عند ١٠٠٪ إمرار ضوئى عند طول موجى قدره ٦٥٠ نانومتر .

٤ - قم بقراءة باقى الأنابيب باستخدام الإسبكتروفوتومتر ، ثم ارسم منحنى العلاقة بين الضوء الممتص ، وتركيز النياسين بالأنابيب .

٥ - حضن هذه الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة أخرى .

٦ - ضف ٠,١ مل من دليل بروم ثيمول بلو ، ثم عادل كل أنبوبة باستخدام NaOH ٠,١ ع ، مع رج الأنابيب أثناء إجراء المعادلة ، حتى الوصول إلى pH ٧ (لون أخضر مزرق) . ضف ١, مل أخرى من الدليل لكل ١ مل من محلول NaOH تم استخدامه - ويلاحظ أنه إذا زاد حجم محلول التعادل عن حجم الأنبوبة ، استخدم الدوارق التى أمامك لاستمرار عملية التعادل ، ثم أعد المحلول إلى الأنبوبة لتسهيل مقارنة الألوان ، بحيث يجب أن تأخذ جميع الأنابيب لونا واحدًا (انظر شكل ١) .



شكل (١) : عملية التعادل لقياس كمية الحامض .

٧ – سجل كمية NaOH المستخدمة للتعادل فى كل حالة .

٨ – ارسم العلاقة بين تركيز النياسين ، وحجم NaOH المستخدم .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هو التفسير المحتمل لحدوث نمو فى الأنبوبة رقم ١ (الخالية من النياسين) ؟

٢ – لماذا يجب استخدام أنبوبة غير ملقحة كمقارنة عند قياس العكارة ؟

٣ – هل تكون العلاقة دائمًا خطية بين الامتصاص الضوئى ، وتركيز النياسين ؟ لماذا ؟

تـدريـب (٢٤)

التمثيل الضوئى فى البكتيريا Bacterial photosynthesis

تستخدم البكتيريا الممثلة للطاقة الضوئية ، مثل : الطحالب ، والنباتات الضوء فى الأيض والنمو ، ولكن يختلف عدد ونوع مواقع التمثيل الضوئى ، والصبغات الضوئية ، وطبيعة مانح الهيدروجين فى التمثيل الضوئى البكتيرى .

ومثالاً على ذلك .. تستخدم البكتيريا الخضراء المزرقة ، الفيكوبيليبروتين phycobiliprotein ، والكلوروفيلات Chlorophylls ، ومشابهات الكاروتين Carotenoids فى عملية التمثيل الضوئى ، بينما نجد أن الصبغات فى البكتيريا القرمزية ، والخضراء الممثلة للضوء ، تضم الكلوروفيل البكتيرى bacteriochlorophylls ومشابهات الكاروتين Carotenoids (ويعكس اللون المميز لهذه البكتيريا التركيز النسبى لهذه الصبغات ، وتسود المواد الكاروتينية غالبا على الكلوروفيل البكتيرى) . أما فى البكتيريا المحبة للملوحة halobacteria .. فتوجد صبغة البكتريورودوبسين bacteriorhodopsin (وتسمى بهذا الاسم لأنها تشابه الرودوبسين الموجود فى الشبكية) .

وبينما نجد أن التمثيل الضوئى فى البكتيريا الخضراء المزرقة ، عملية هوائية تتضمن التحليل الضوئى للماء وتصاعد الأكسجين ، نجد أن الأنواع الأخرى من التمثيل الضوئى البكتيرى لاهوائية فى طبيعتها . والبكتيريا الخضراء المزرقة ، مثل : النباتات ، والطحالب ، تستخدم الماء كمصدر للقوة الاختزالية ، أما باقى عمليات التمثيل الضوئى البكتيرى فتستخدم فيها مواد مثل : H_2 ، والكبريتيدات ، والمواد العضوية كمواد اختزالية .

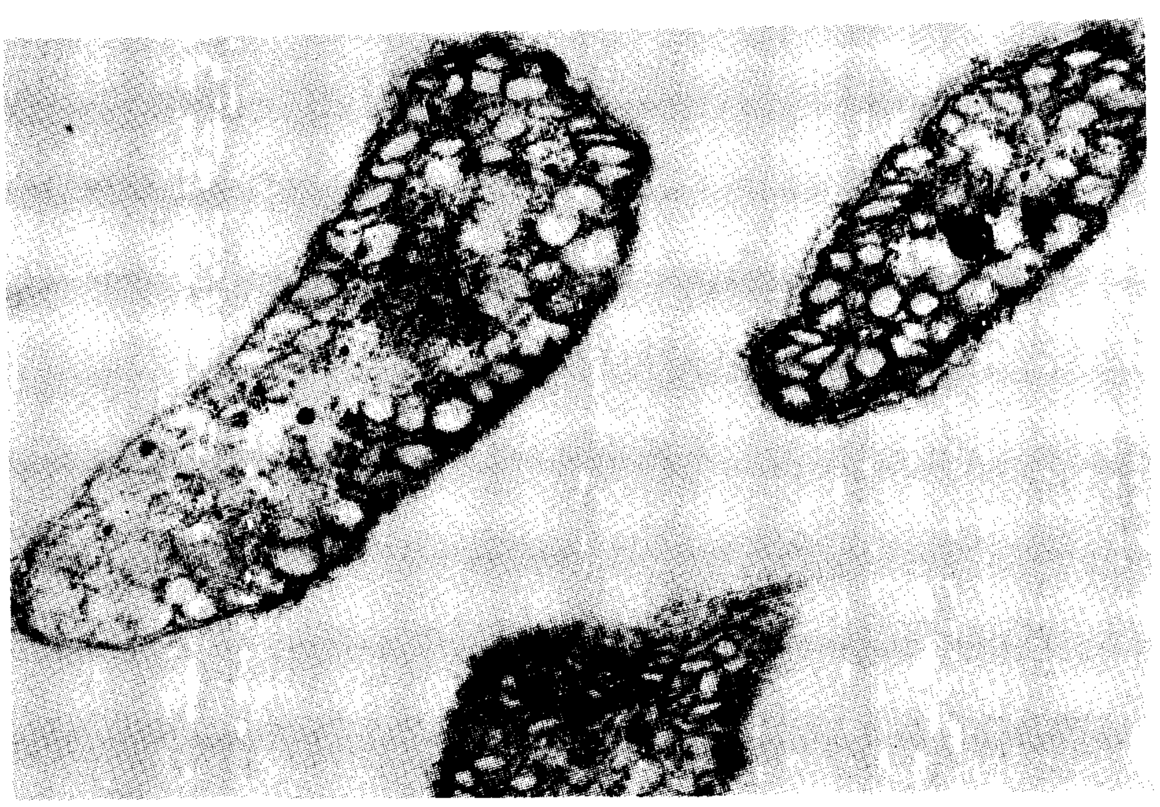
والمادة المانحة للهيدروجين (المادة المختزلة) فى البكتيريا القرمزية ، والخضراء الكبريتية يتمثل فى

عدد من المركبات الكبريتيدية . أما البكتيريا القرمزية غير الكبريتية ، والبكتيريا المحبة للملوحة halobacteria فإنها تستخدم مركبات عضوية كمواد مختزلة ، ومصدر للكربون فى عملية التمثيل الضوئى . وعلاوة على ذلك .. فإن البكتيريا الأخيرة فى غياب الضوء لا تعتبر إجبارية بالنسبة للتمثيل الضوئى ، حيث يمكنها تحت الظروف الهوائية أن تستخدم المواد العضوية Chemoheterotrophic ، وتستخدم المواد العضوية كمصدر للطاقة فى التمثيل الخلوى .

وفى هذا التدريب .. سوف ندرس النمو تحت ظروف التمثيل الضوئى ، وتحت ظروف استخدام المواد العضوية كمصدر للطاقة فى حالة البكتيريا القرمزية غير الكبريتية *Rhodopseudomonas* .
(لاحظ فى شكل (١) – صورة لنوع آخر من البكتيريا الممثلة للضوء *Rhodospirillum rubrum*) .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – فى دورقين (سعة ٢٥٠ مل) معقمين ، ضف تحت ظروف التعقيم بيئة لاسيلس Lascelles'medium وذلك حتى عمق واحد سنتيمتر ، حيث تُستخدم البيئة فى الدورقين كطبقة رقيقة للتنمية الهوائية . بالنسبة للتنمية غير الهوائية .. يتم ملء دورقين (٢٥٠ مل) بيئة لاسيلس حتى عنق الدورق .



شكل (١) : صور بالميكروسكوب الإلكترونى للتركيب الدقيق للبكتيريا الممثلة للضوء *Rhoaospirillum rubrum* . **تمثل الأجسام البيضاء حاملات الصبغات Chromatophores وهى مواقع الصبغات الممثلة للضوء (عن A.E. Vatter and R.S. wolfe, J. Bact. 75: 484, 1958) .**

٢ – يتم تلقيح كل دورق بـ ١, مل من مزرعة *Rhodopseudomonas spheroides* .

٣ – تتم تغطية دروقين (أحدهما هوائى ، والآخر لاهوائى) بورق القصدير لمنع وصول الضوء .

٤ – حضن الدوارق الأربعة عند ٣٠°م فى وجود الضوء لمدة ٢ – ٧ أيام حتى ظهور النمو .

٥ – تزال أوراق القصدير وتقارن كمية النمو ، والتلون فى الدوارق الأربعة .

أسـئلة QUESTIONS

١ – هل يعتبر التغير فى كمية الصبغة هو التغير الوحيد الذى يعكس النمو تحت مختلف الظروف ؟

٢ – ما معنى الفسفرة الضوئية الدائرية cyclic photophosphorylation ؟

٣ – أين ، وتحت أى ظروف يمكنك أن تجد البكتيريا الممثلة للضوء المحبة للملوحة ؟

تـدريـب (٢٥)

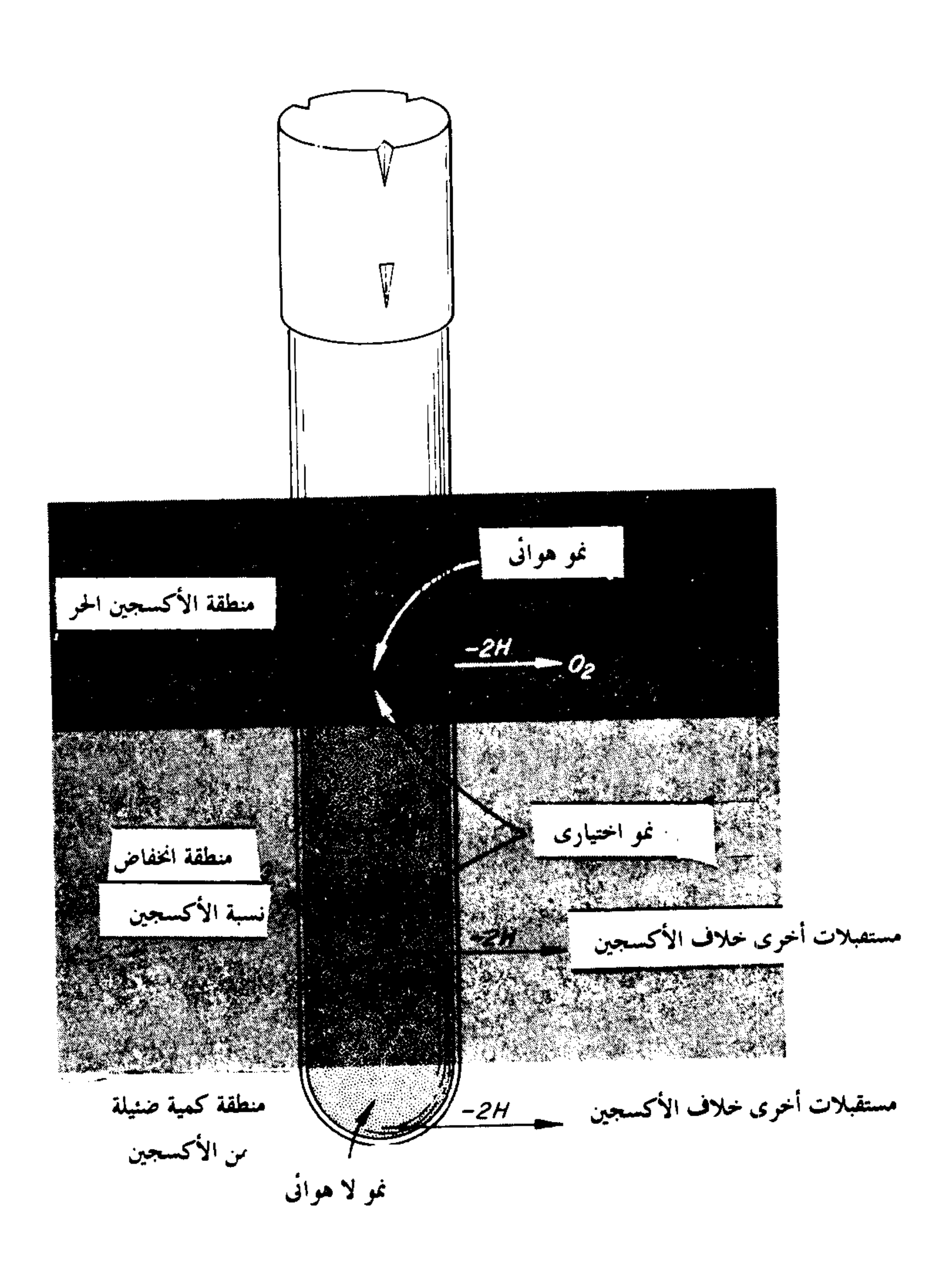
علاقة الأكسجين الحر بنمو الميكروبات

Relation of Free Oxygen to Microbial Growth

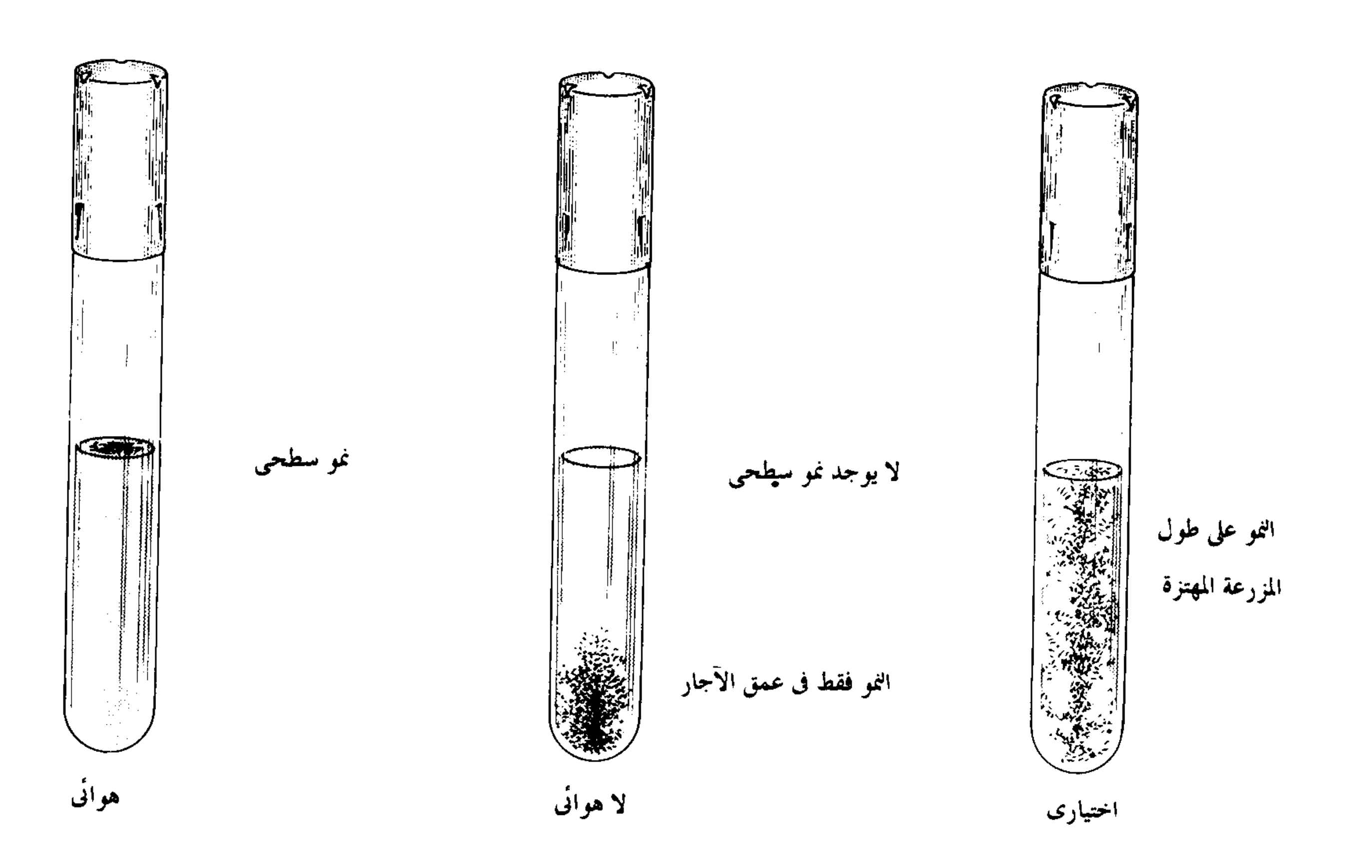
تختلف أنواع البكتيريا كثيرًا من حيث احتياجها للأكسجين الغازى (انظر شكل ١) . فبعض البكتيريا لاتستطيع النمو فى غياب الأكسجين ، والبعض الآخر لايستطيع النمو فى وجوده ، بينما تتأقلم بعض الميكروبات للنمو فى وجود وغياب الأكسجين . ويطلق على الميكروب الذى يحتاج الأكسجين لنموه اسم ميكروب هوائى aerobic ، ويسمى ذلك الذى يثبطه وجود الأكسجين لاهوائى (anaerobic) ، وذلك الذى يستطيع أن ينمو فى الظروف الهوائية واللاهوائية ، فيسمى لاهوائى اختيارى facultative anaerobe .

أغلب الميكروبات فى المملكة الميكروبية ليست هوائية ، أو لاهوائية اجبارية ، ولكنها تقع فى حالة وسطية ، بحيث تتدرج الميكروبات المختلفة فى احتياجها للأكسجين . لهذا تُستخدم اصطلاحات أخرى خلال الاصطلاحات : هوائى ولاهوائى واختيارى ، لوصف الاحتياجات الأكسجينية لأنواع

الميكروبات المختلفة . ومثالاً على ذلك .. الميكروبات المحبة للهواء بنسبة قليلة microaerophilic ، وهى تلك الميكروبات التى تحتاج إلى الأكسجين الحر ، ولكن بتركيز محدود للغاية . أما البكتيريا المتحملة للهواء aerotolerant .. فهى تلك البكتيريا اللاهوائية التى تتحمل ، وتستطيع النمو فى وجود نسبة من الأكسجين ، أقل من تلك الموجودة فى الجو العادى .



شكل (١) : العلاقة بين تركيز الأكسجين فى البيئة الصلبة ، وبين أنواع النمو الميكروبى .



شكل (٢) : مواقع النمو الميكروبى فى أنابيب مزارع الآجار المهتزة .

وعلاوة على دور الأكسجين كمستقبل نهائى للإلكترونات فى تنفس الخلايا .. فإنه يؤثر على جهد التأكسد ، والاختزال فى الخلايا . وتحتاج كثير من النظم الإنزيمية الموجودة فى البكتيريا إلى ظروف عالية الاختزال ؛ أى جهد تأكسد ، واختزال منخفض لكى تعمل ، بينما يحتاج البعض الآخر ظروفا مؤكسدة ؛ أى جهد تأكسد ، واختزال مرتفع .

وفى هذه التجربة سوف نستخدم مزارع الآجار المهتزة ، التى سوف يحدد بواسطتها موضع منطقة النمو فى الأنبوبة ، كمقياس للاحتياجات الأكسجينية للميكروبات المدروسة .

PROCEDURE

طريقة العمل

١ - أصهر ثلاث أنابيب بيئة مستخلص الخميرة ، والتربتون واحتفظ بها عند ١٠٠ °م لمدة عشر دقائق لطرد الأكسجين المذاب .

٢ - برد الأنابيب حتى ٤٢ - ٤٥ °م ، ثم لقح كل منها تلقيحا كثيفا (عدة غمسات بإبرة التلقيح) بإحدى المزارع التالية : *Escherichia coli Micrococcus luteus, Costridium perfringens* . در الأنابيب الملقحة برفق لتوزيع اللقاح ، مع الحرص بعدم رج الأنابيب بطريقة تؤدى إلى دخول فقاعات من الهواء داخل الآجار .

٣ – اترك الآجار ليتصلب بوضع الانابيب فى ماء بارد (أقل من ٤٠ °م) . (انظر شكل ٢) .

أسـئلة QUESTIONS

١ – عرف الأكسدة ، وما هى الأكسدة البيولوجية ؟

٢ – عرف التنفس ، والتخمر ، والتنفس اللاهوائى ؟

تدريـب (٢٦)

التنمية اللاهوائية للبكتيريا Anaerobic Culture of Bacteria

يرتبط تأثير الأكسجين الجوى على نمو الميكروبات ، ارتباطًا كبيرًا بجهد الأكسدة والاختزال للبيئة . ويعتبر جهد الأكسدة والاختزال O/R potential مقياسا لدرجة الأكسدة ، أو الاختزال لمركب ، أو وسط ما . فالمركب الذى به نسبة عالية من الهيدروجين إلى الأكسجين (أعلى من النسبة الموجودة فى الماء) يكون عالى الاختزال ، أى له جهد أكسدة ، واختزال سالب negative O/R potential . أما المادة العالية الأكسدة فلها جهد أكسدة ، واختزال موجب positive O/R potential . وتستطيع البكتيريا اللاهوائية النمو عندما يتم استبعاد الأكسجين الحر من الوسط ، أو بتوفير جهد أكسدة ، واختزال منخفض ، بإضافة كمية كافية من مواد مختزلة لبيئة النمو . وسوف نقوم فى هذا التدريب بتوضيح هذه العلاقات .

يوجد بين البكتيريا اللاهوائية الإجبارية ، مدى واسع فى مقاومتها لتأثير الأكسجين . فبعضها ينمو نموا ضعيفا فى وجود الأكسجين ، بينما يتطلب البعض الآخر لنموه الغياب التام للأكسجين الحر .

وتتم حماية المزارع اللاهوائية من أثر الأكسجين الحر بعدة طرق :

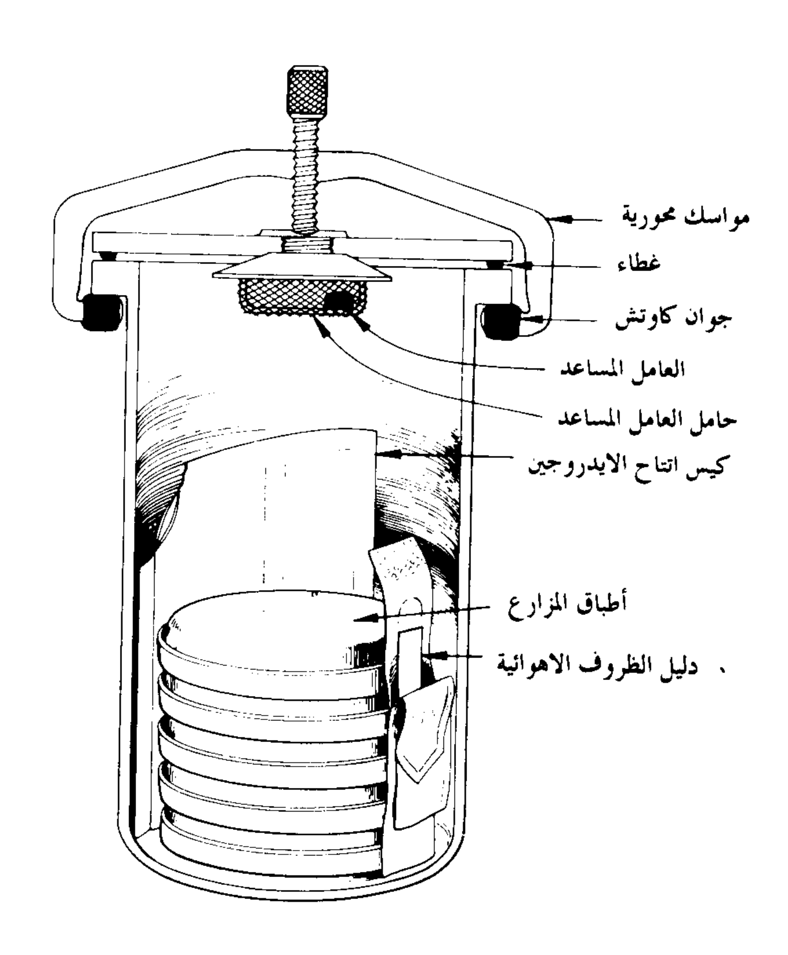
١ – يمكنك التخلص من الأكسجين من المزرعة بالغليان ، ثم منع إعادة دخوله فيها بتغطيتها بطبقة عازلة من الفاسبار ، أو الزيت المعدنى . وهذه الطريقة تناسب عدة بيئات مثل : البيئات المستخدمة فى اختبارات التخمر . ومن المهم فى هذه الحالة غليان البيئة لمدة عشر دقائق ، ثم التبريد السريع إلى ٤٠ – ٤٥ °م ، والتلقيح تلقيحًا كثيفا (بنقطة ، أو بعدة غمسات بإبرة التلقيح) بدون رج ، ثم التغطية بالطبقة العازلة بعد التلقيح .

٢ – من الممكن استخدام بعض البيئات التى تحتوى على عوامل مختزلة مثل : ثيوجليكولات

الصوديوم ($HSCH_2$ COONa) . وهذا المركب يتفاعل مع الأكسجين ويحافظ على إنزيمات الخلية فى الحالة المختزلة ، ويستخدم فى البيئات السائلة (والتى لا يمكن إضافة طبقة عازلة إليها) ، كما يستخدم فى الآجار الذى يصب فى الأطباق .

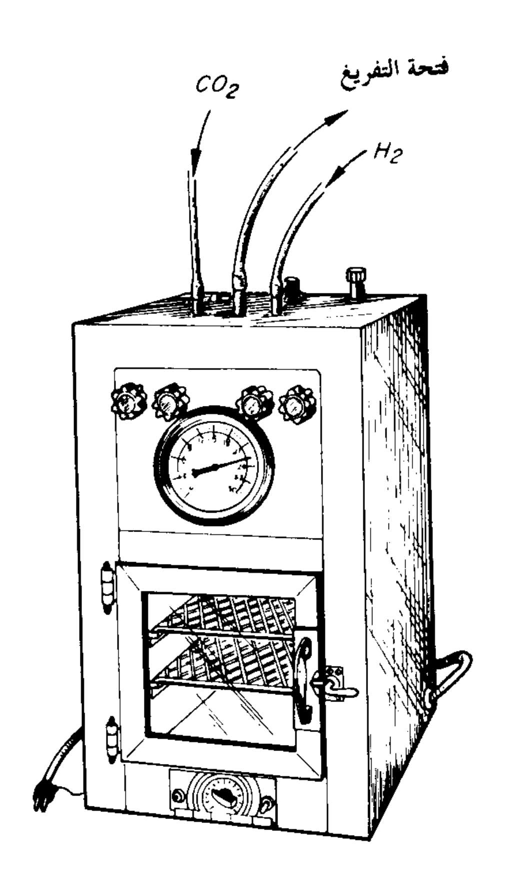
٣ - من الممكن إزالة الأكسجين من الجو فى وعاء مغلق بعدة طرق :

(أ) باستخدام وعاء بريور للتنمية اللاهوائية Brewer jar ، أو تصميمات أخرى مشابهة . حيث يتم تحضين الأطباق ، أو الأنابيب فى الوعاء مع أى مادة متوفرة قادرة على إنتاج الهيدروجين ، وثانى أكسيد الكربون عند إضافة الماء (انظر شكل ١) . ثم يتم التفاعل بين الهيدروجين والأكسجين الموجودين داخل الوعاء باستخدام البلاتين كعامل مساعد .



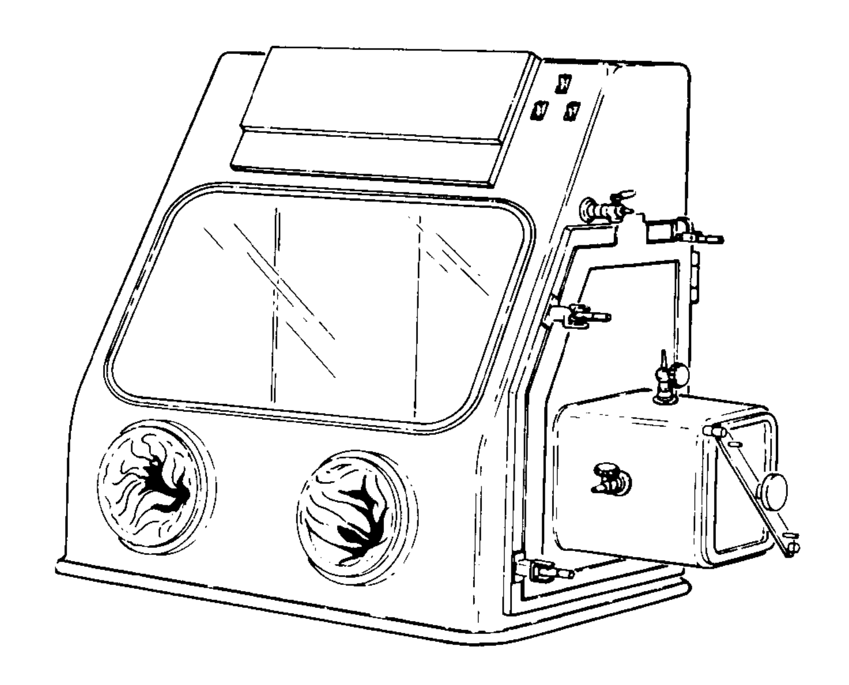
شكل (١) : وعاء بريور مع استخدام الهيدروجين (عن J.H. Brewer and D. Allgeier Appl. Microbiol. 14 ((6): 986, 1966).

(ب) بإحلال غاز خامل محل الأكسجين الموجود فى الهواء ، وهذه الطريقة واسعة الاستعمال ، ولها عدد من المميزات . حيث توضع أطباق الآجار ، أو الأنابيب المطلوب تحضينها داخل حضان لاهوائى ، ويتم تفريغ الحاضن من الهواء ، ثم يدخل فيه غاز ثانى أكسيد الكربون ، أو الهيدروجين ، أو النيتروجين (انظر شكل ٢) .



شكل (٢) : الحاضن اللاهوائى الذى يستخدم فى جو من الغازات المختلفة .

٤ - عندما يكون المطلوب التعامل مع المزارع ، وغيرها من المواد فى غياب الأكسجين ، يستخدم ما يسمى بصندوق القفازات glove box (انظر شكل ٣) ، وهو وحدة مغلقة يمكن استبدال الهواء فيها بمخلوط الغازات المطلوب . ويتم العمل داخل الجهاز باستخدام قفازات مطاطية محكمة الغلق ، ويمكن تجهيز الصندوق من الداخل بنظام للإمداد بالغاز ، والأشعة فوق البنفسجية ، والتيار الكهربى .



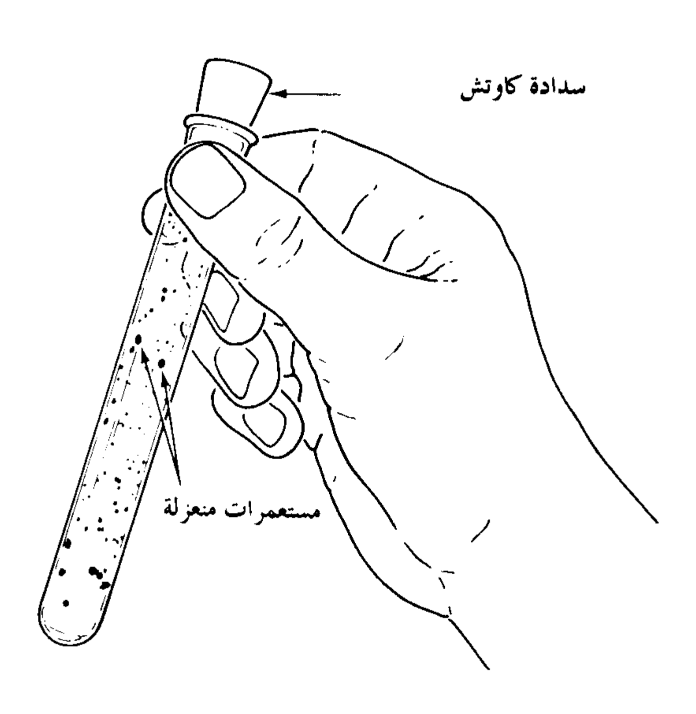
شكل (٣) : صندوق القفازات المستخدم فى الزراعة اللاهوائية .

٥ – لابد من استخدام طرقًا أكثر تخصصا عندما نريد عزل ، وتنمية ميكروبات لاهوائية حساسة للأكسجين* . وتتضمن هذه الطرق استخدام بيئات سبق اختزالها ، وتعقيمها ، وتم الاحتفاظ بها فى أنابيب مزارع ، أو زجاجات محكمة الغلق . وللتأكد من المحافظة على عدم وجود الأكسجين فى البيئات .. يضاف إليها عامل مختزل مثل : السيستئين cysteine . كما تحتوى البيئة أيضًا على صبغة قابلة للأكسدة ، والاختزال مثل : الريزازورين resazurin كدليل للتأكد من توافر الظروف اللاهوائية فى البيئة . ونظرًا للطبيعة المعقدة لكثير من الميكروبات اللاهوائية .. فإنه يجب أن تتم كل خطوات التعامل تحت ظروف طريقة التنمية اللاهوائية ، وفى وجود تيار من غاز خال من الأكسجين للمحافظة على الظروف اللاهوائية .

ويتم التلقيح فى بيئات الآجار وهى لاتزال سائلة عند ٤٥° م فى نظام مغلق ، أو مفتوح . ففى النظام المغلق (طريقة هنجات Hungate) .. تتم إضافة اللقاح بواسطة حقنة ، أو إبرة من خلال غطاء مطاطى يغطى أنبوبة المزرعة . أما فى النظام المفتوح .. فيزال الغطاء المطاطى عند التلقيح ، مع دفع غاز خال من الأكسجين باستمرار داخل الأنبوبة المفتوحة أثناء التلقيح ، باستخدام الإبرة ذات العقدة ، أو ماصة باستير . وتتم تغطية الأنبوبة بسرعة بعد التلقيح وتوضع فى الجو اللاهوائى . وبعد

* هذه الطرق يطلق عليها عادة اسم طريقة هنجات Hungate technique (عن الدكتور هنجات R.E. Hungate الذى يعتبر مكتشف هذه الطريقة) وطريقة VPI (عن Dr. W.E.C. Moore ومساعدوه فى معهد Virginia Polytechnic Institute الذى تم فيه تعديل وتحسين هذه الطرق) .

ذلك تتم إدارة كل أنبوبة فى جهاز خاص حتى يتم تصلب الآجار على جدران الأنبوبة . وبعد التحضين .. تظهر المستعمرات المنعزلة على طبقة الآجار على جدران الأنابيب (انظر شكل ٤) .



شكل (٤) : أنبوبة هنجات الدوارة عليها المستعمرات المنعزلة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – تتم إسالة أنبوبتين من آجار الجلوكوز ومستخلص الخمير فى حمام مائى ، أو باستخدام البخار . استمر فى التسخين لمدة ١٠ دقائق للتخلص من الأكسجين المذاب فى البيئة ، برد الأنابيب فى حمام مائى حتى ٤٥° م ، ولقح إحداها بمزرعة *Clostridium perfringens* والأخرى بمزرعة *Clostridium sporogenes* مع التلقيح الكثيف ، والتوزيع الجيد للقاح .

٢ – لقح أنبوبة من مرق الثيوجليكولات بعد غليانها وتبريدها بكل من المزرعتين السابقتين .

٣ – لقح أنبوبتين من مرق الجلوكوز ، ومستخلص الخميرة بعد غليانها وتبريدها ، بكل من المزرعتين اللاهوائيتين السابقتين . تتم تغطية أنبوبة من كل مجموعة بطبقة سمكها ٢ سم من آجار معقم (٥٪) أو فاسيار مسال .

٤ – خطط طبق بيئة آجار بكل من المزرعتين اللاهوائيتين . ضع الطبق فى وعاء لاهوائى ، أو كيس من البلاستيك . اقطع ركن ورق القصدير لكيس تفاعل إنتاج الهيدروجين (Gas pak, BBL) ، وضع فيه ١٠ مل ماء بسرعة ، ثم ضعه فى داخل الوعاء اللاهوائى مع الأطباق

الملقحة . تأكد من أن غطاء الوعاء اللاهوائى يحتوى على الشبكة السلك الخاصة بالعامل المساعد اللازم للتفاعل ، احكم غلق غطاء الوعاء بواسطة مسامير الربط .

٥ - حضن المزارع على ٣٧° م وافحصها فى الدرس العملى التالى . افحص مزارع بيئة آجار الجلوكوز المهتزة لوجود المستعمرات ، ولاحظ المنطقة التى يحدث فيها النمو من الأنبوبة . ولاحظ إن كانت هناك أى مظاهر لإنتاج غاز .

افحص سطح أنابيب الآجار المائل بدقة لملاحظة وجود مستعمرات نامية ، وقارن بين نمو تلك المحضنة لاهوائيا مع تلك المحضنة هوائيا . افحص أنابيب بيئة مرق الثيوجليكولات ، وبيئة مرق الجلوكوز ، ومستخلص الخميرة لوجود النمو ، ولاحظ أين يحدث النمو فيها ، ولاحظ أيضا رائحة المزارع .

أسـئلة QUESTIONS

١ - لماذا لا يؤدى ذوبان الأكسجين فى بيئة الثيوجكيلولات إلى تثبيط نمو الميكروبات اللاهوائية ؟

٢ - هل ينمو نوعا جنسى *Clostridium* بنفس الطريقة فى نفس البيئات ؟

تـدريـب (٢٧)

تأثير المطهرات ، والمواد القاتلة للميكروبات

Antiseptic and Disinfectant Action

فى كفاحنا للتحكم فى الميكروبات المسئولة عن الفساد ، والأمراض .. تم اكتشاف آلاف من المواد الكيميائية العضوية وغير العضوية السامة للميكروبات . وتؤدى المادة الكيميائية إما إلى تثبيط النشاط والنمو ، أو إلى قتل الميكروبات . وتستخدم المواد المثبطة للنمو لتطهير الجلد ، وتسمى مواد مطهرة antiseptics ، وهذه المواد عادة توقف النمو البكتيرى .

أما المواد القاتلة للميكروبات disinfectants فتقوم بقتل البكتيريا . من هذه المواد : الكحولات ، والهالوجينات ، والألدهيدات ، والفينولات ، ومعقدات المعادن الثقيلة ، ومركبات الأمونيوم الرباعية . وهى تختلف فى طريقة عملها ، فتتخثر البروتينات الأساسية بتأثير الكحولات ، كما تتأكسد بتأثير الكلور ؛ أما الفورمالدهيد فإنه يتحد مع مجاميع الآمين فى البروتينات ، بينما تتحد المعادن الثقيلة مثل : الزئبق ، والفضة مع البروتين ، وتثبط الإنزيمات . وتؤثر الفينولات ، ومركبات

الأمونيوم الرباعية على الغشاء السيتوبلازمى . ويصبح كثير من هذه المواد عديم التأثير ، فى وجود تركيزات مرتفعة من المادة العضوية ، أو الصابون ، أو المنظفات .

انظر شكل (١) الذى يوضح تركيب المركب الفينولى الواسع الاستعمال ، وهو الهكساكلوروفين hexachlorophene ، وأحد مركبات الأمونيوم الرباعية وهو كلوريد بنزالكونيوم benzalkonium chloride ، ويوضح هذا التدريب مقارنة بين التأثير المطهر ، والقاتل لعدد من المواد السامة .

n* تتراوح من ٨ إلى ١٨

شكل (١) : المواد القاتلة للميكروبات .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - احضر أنبوبتى آجار مغذى مبردتين إلى ٤٥° م .

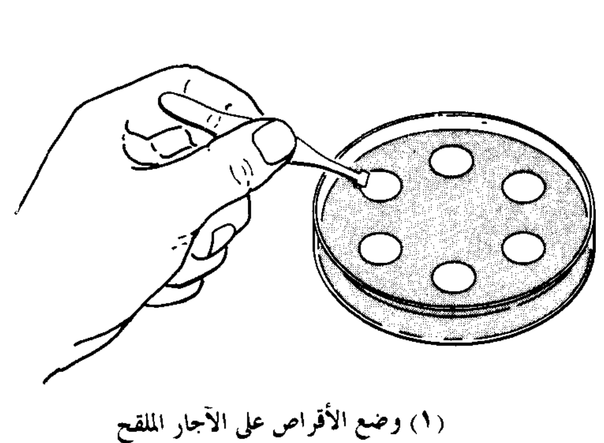
٢ - لقح إحداهما بـ ٥, مل من مزرعة *Escherichia coli* ، والأخرى بـ ٥, مل *Bacillus subtilis* . رج الأنبوبتين جيدًا ثم صبهما فى طبقى بترى معقمين واتركهما ليتصلبا .

٣ - باستخدام ملقاط معقم (بحرقه مع الكحول) ، وزع ستة أقراص ورق ترشيح متباعدة فى الطبق .

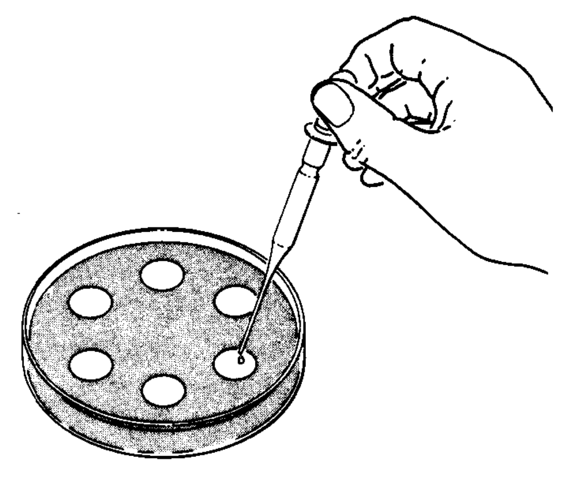
٤ - باستخدام ماصات باستير الموجودة أمامك فى محلول مطهر .. ضف نقطة أو اثنتين من مختلف المواد إلى الأقراص فى كل طبق ، اكتب البيانات على الأطباق موضحا العامل الكيميائى المستخدم فى كل قرص .

٥ - حضن الأطباق (دون أن تقلبها) عند ٣٧° م حتى الدرس العمل التالى .

٦ – افحص كل طبق وقس قطر منطقة تثبيط النمو . وضع النتائج فى جدول فى أوراق التقارير الخاصة بك .

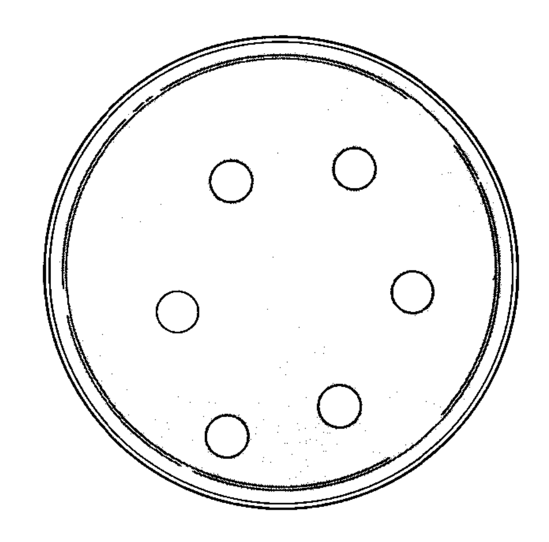


(١) وضع الأقراص على الآجار الملقح



(٢) إضافة المطهرات ، والمواد القاتلة

شكل (٢) : طريقة إضافة المواد المطهرة ، أو القاتلة للأطباق الملقحة بالبكتيريا .



شكل (٣) : مناطق التثبيط حول المواد المطهرة ، والقاتلة .

وطريقة المقارنة المستخدمة هنا ، لها نقاط ضعف واضحة ، إذا ما تطلبت الدراسة نتائج مؤكدة . وللحصول على مقياس حقيقى ودقيق للكفاءة التثبيطية ، أو القاتلة لمادة .. نضع فى الاعتبار تركيز الميكروبات ، وتركيز المادة القاتلة ، ودرجة الحرارة ، ورقم الأس الأيدروجينى ،

ومعدل الذوبان النسبى للمادة المختبرة فى الماء . وعلاوة على ذلك .. فإن المواد الكيميائية المختلفة تنتشر بمعدلات مختلفة ، كما يتم تثبيط عملها بدرجات مختلفة فى البيئات المزرعية . وبعض المواد مثل : مركبات الأمونيوم الرباعية لايمكن اختبارها بهذه الطريقة لأنها تتفاعل مع البيئة ، وتعطى نتائج لايعتد بها .

ولاختبار كفاءة مادة قاتلة .. يتخذ الفينول كمادة قياسية للمقارنة ، وتقارن الكفاءة النسبية للمادة الجديدة مع كفاءة الفينول تحت ظروف قياسية . ونسمى النسبة بين سمية المادة المختبرة ، وتلك الخاصة بالفينول ، على ميكروبات اختبار Test organisms هى *Salmonella typhi* (سالب الجرام) ، *Staphylococcus aureus* (موجب الجرام) ، باسم المعامل الفينولى Phenol coefficient للمادة القاتلة المدروسة ، وتتخذ مقياسا لكفاءة المادة المختبرة .

ومن غير المعروف جيدًا أسباب التأثير السام لأكثر المواد المطهرة ، والقاتلة . ولكن كل منها يؤثر تأثيرًا ضارًا على الخلية ، إما بإحداث خلل فى تركيب الخلية الفيزيائى ، أو من خلال إيقافها لنظام تكوين الطاقة ، أو النشاط التمثيلى بالخلية .

أسـئلة QUESTIONS

١ – هذا التدريب لم يبين هل التأثير الحادث تثبيط أم قتل . قم بتجربة تمكنك من التمييز بين التأثيرين .

٢ – هل تنمو أى ميكروبات فى منطقة التثبيط فى حالة أى من المواد المطهرة ، أو القاتلة ؟ وضح ذلك ؟

٣ – ما هى العوامل الأخرى ، خلاف تثبيط النمو بالمادة الكيميائية ، التى تؤثر على حجم منطقة التثبيط ؟

٤ – اذكر ثلاثة احتمالات لطريقة تأثير المركبات المثبطة للنمو .

٥ – اذكر ثلاثة أنواع من المواد الكيميائية التى تنتمى إليها المواد الكيميائية المثبطة للميكروبات ؟

تـدريــــب (٢٨)

التأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية وإعادة التنشيط ضوئيا

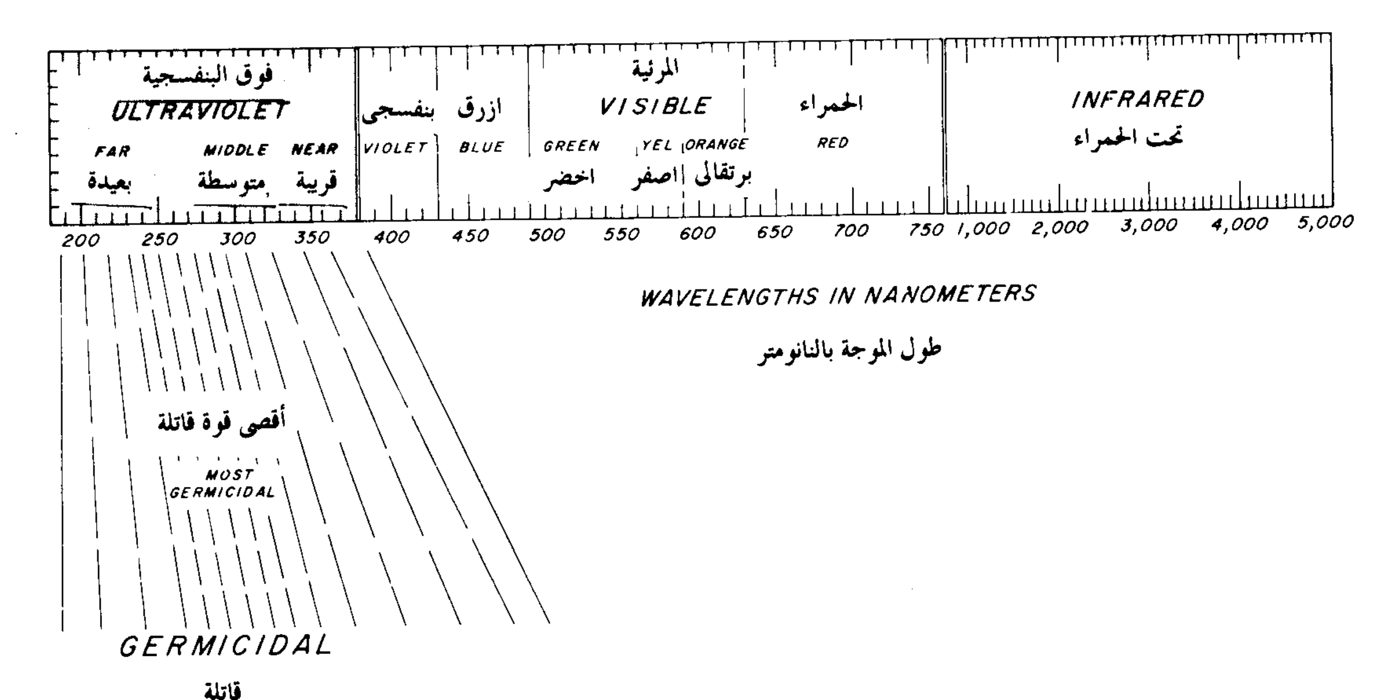
Lethal Action of Ultraviolet Light; Photoreactivation

رغم أن بعض الأطوال الموجية للضوء المرئى مفيدة أو حتى ضرورية لبعض البكتيريا – مثل : الأنواع الممثلة للضوء – إلا أن ضوء الشمس عادة ما يكون ضارا لأغلب البكتيريا . ويرجع هذا التأثير الضار أساسا إلى احتوائه على الأشعة فوق البنفسجية (UV) ، خصوصا تلك التى تقع فى طول موجى يقع بين ٢٤٠ – ٣٠٠ نانومتر ، بأقصى قوة قاتلة لأغلب الميكروبات قرب ٢٦٥ نانومتر .

ويتميز الحامض النووى ديوكسى ريبونيوكليك Deoxyribonucleic acid ، بأن أقصى امتصاصة للأشعة فى مدى الأشعة فوق البنفسجية يكون عند ٢٦٥ نانومتر ، وأن الأشعة عند هذا الطول الموجى تؤثر بشدة على معدل تكوين الطفرات . وتؤدى الأشعة فوق البنفسجية إلى حدوث ازدواج للقواعد المجاورة dimer formation ، والذى ترتبط فيه قواعد البيريميدين المتجاورة على نفس سلسلة الـ DNA مع بعضها ، وأحيانًا ترتبط القواعد على سلسلتين مختلفتين ؛ مما يؤثر على التضاعف العادى ، والعمل الطبيعى للـ DNA . وعلى هذا .. فإن الخلية البكتيرية التى تعرضت للأشعة لاتستطيع النمو ، وتموت .

ويمكن تقليل التأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية ، بتعريض المزرعة بعد المعاملة مباشرة ، للاشعة المرئية عند طول موجى ٣٦٥ – ٤٥٠ ناتومتر (انظر شكل ١) ، ويسمى هذا التأثير المعاكس للتأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية ، التنشيط الضوئى *photoreactivation* . ويحدث فى التنشيط الضوئى ، أن الضوء المرئى يُنشّط إنزيمًا يعمل على تكسير الروابط المزدوجة بين مجاميع البيريميدين ، الناتجة عن المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية ، بما يعيد الـ DNA إلى حالته الطبيعية . وعلى هذا فإن .. العدد الكلى للخلايا الحية بعد التعريض للأشعة المرئية مباشرة بعد المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية ، سيصبح أضعاف ذلك العدد الناتج بعد التعريض للأشعة فوق البنفسجية فقط . ولكن هناك بعض الخلايا التى يصيبها ضرر لا يمكن إصلاحه بالتنشيط الضوئى .

وفى هذا التدريب .. سوف تفحص التأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية على بعض المزارع البكتيرية وأيضا سوف تدرس التنشيط الضوئى .



شكل (١) : الطيف الضوئى .

طريقة العمل PROCEDURE

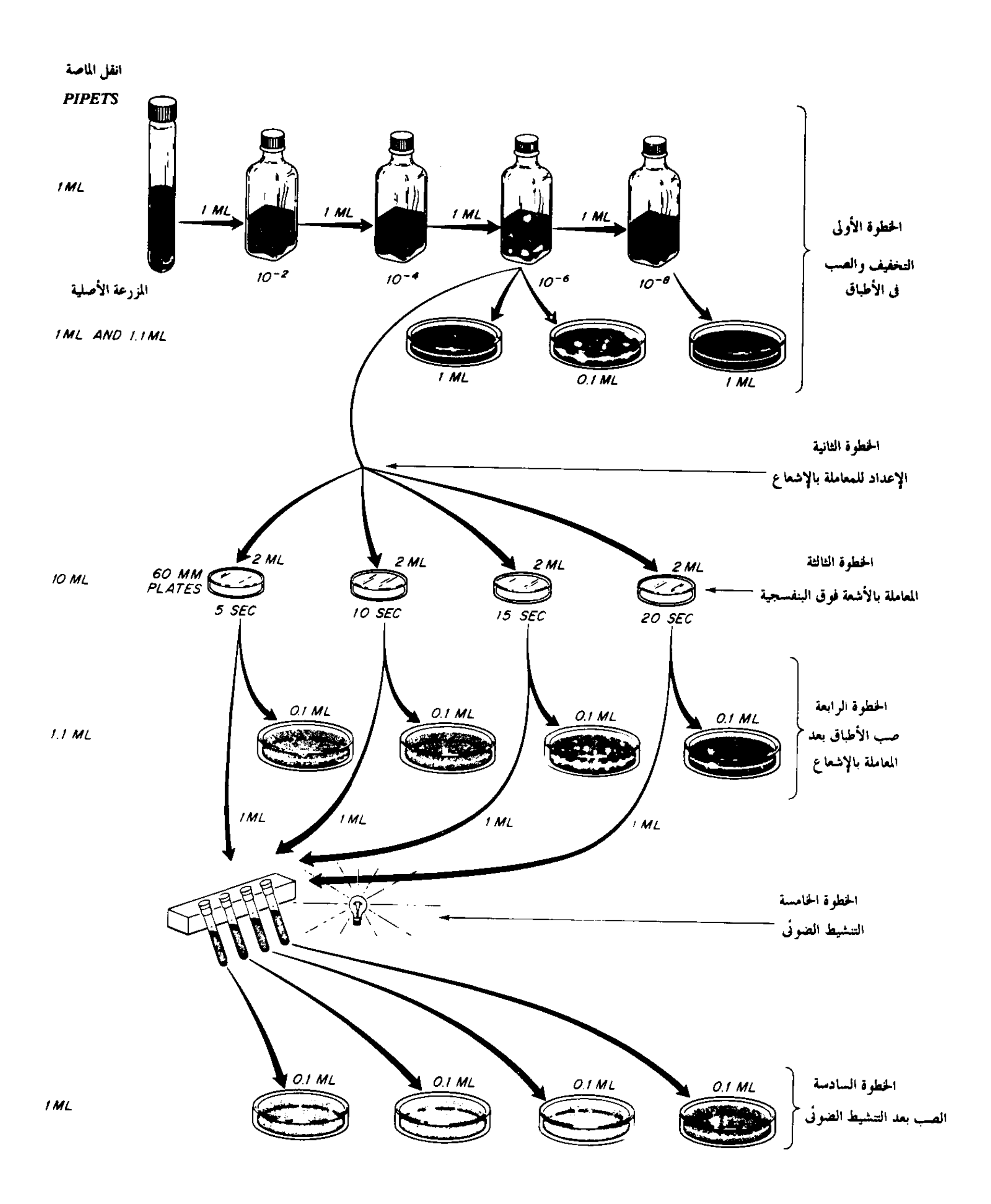
انظر الرسم التخطيطى لطريقة العمل فى شكل ٢ ، وتمثل الخطوات من ١ – ٦ التالية ، تلك التى من ١ – ٦ فى الرسم التخطيطى .

١ – اعمل أطباقا مصبوبة من تخفيفات ١٠^-٦ ، ١٠^-٧ ، ١٠^-٨ لمزرعة عمرها ٢٤ ساعة من *Escherichia coli* نامية على بيئة آجار تربتكاز صوى trypticase soy agar (انظر شكل ٢) . ومن عد المستعمرات بالأطباق (الموضحة فى الدرس العملى التالى) ، يمكنك حساب متوسط عدد الخلايا فى الملليلتر من المزرعة الأصلية .

٢ – ضع ٢ مل من تخفيف ١٠^-٦ للمزرعة فى كل من أربعة أطباق بترى معقمة ، واكتب على هذه الأطباق ٥ ثوان ، ١٠ ثوان ، ١٥ ثانية ، ٢٠ ثانية .

٣ – وعلى أساس فترة التعريض المطلوبة .. ضع كل طبق بالترتيب على الخط الأبيض فى صندوق التعريض للأشعة فوق البنفسجية . انزع غطاء الطبق البترى وافتح الأشعة فوق البنفسجية ، وكل ٥ ثوانى ارفع طبقاً ، واعد تغطيته ، ولف الطبق بورق اللف لمنع حدوث أى تنشيط ضوئى (انظر شكل ٣) .

٤ – بعد التعريض للأشعة فوق البنفسجية .. اعمل تخفيف ١٠^-٧ من كل عينة ، بنقل ١, مل من الطبق المعرض للأشعة إلى طبق آخر معقم ، ثم ضف إليه كمية مناسبة من بيئة آجار



انقل الماصة
PIPETS
1 ML
1 ML AND 1.1 ML
10 ML
1.1 ML
1 ML
المزرعة الأصلية
1 ML
10⁻²
10⁻⁴
10⁻⁶
10⁻⁸
0.1 ML
الخطوة الأولى
التخفيف والصب
فى الأطباق
الخطوة الثانية
الإعداد للمعاملة بالإشعاع
60 MM
PLATES
2 ML
5 SEC
10 SEC
15 SEC
20 SEC
الخطوة الثالثة
المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية
الخطوة الرابعة
صب الأطباق بعد
المعاملة بالإشعاع
الخطوة الخامسة
التنشيط الضوئى
الخطوة السادسة
الصب بعد التنشيط الضوئى

التربتكاز صوى ، ثم اخلط جيدًا بإدارة الطبق ، اكتب على كل طبق المعلومات الآتية : معرض للأشعة ، ومدة التعريض ، والتخفيف (١٠ ^٧) ، ولف الأطباق فى ورق لف .

٥ – انقل ١ مل من كل طبق بعد التعرض للأشعة (من الخطوة ٣) إلى أنبوبة اختبار ، واكتب عليها زمن التعريض .

٦ – صف هذه الأنابيب الأربعة على بعد ١٥ سم من مصباح كهربى قوة ٥٠٠ وات لمدة ٣٠ دقيقة (انظر شكل ٤) .

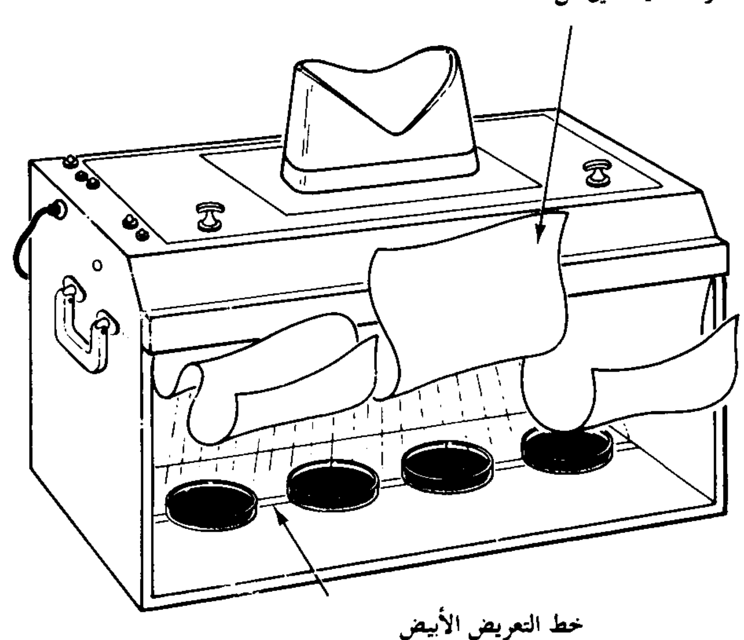
إذا لم يكن مصباح الإضاءة الذى أمامك مزودًا بمروحة تبريد .. ضع الأنابيب فى كأس به ثلج .

٧ – صب أطباق تخفيف ١٠^-٧ من الأنابيب بعد تعريضها للضوء كما اتبعت فى الخطوة رقم ٤ ، واكتب على الأطباق : تنشيط ضوئى ، ومدة التعريض للأشعة فوق البنفسجية ، وتخفيف ١٠^-٧ .

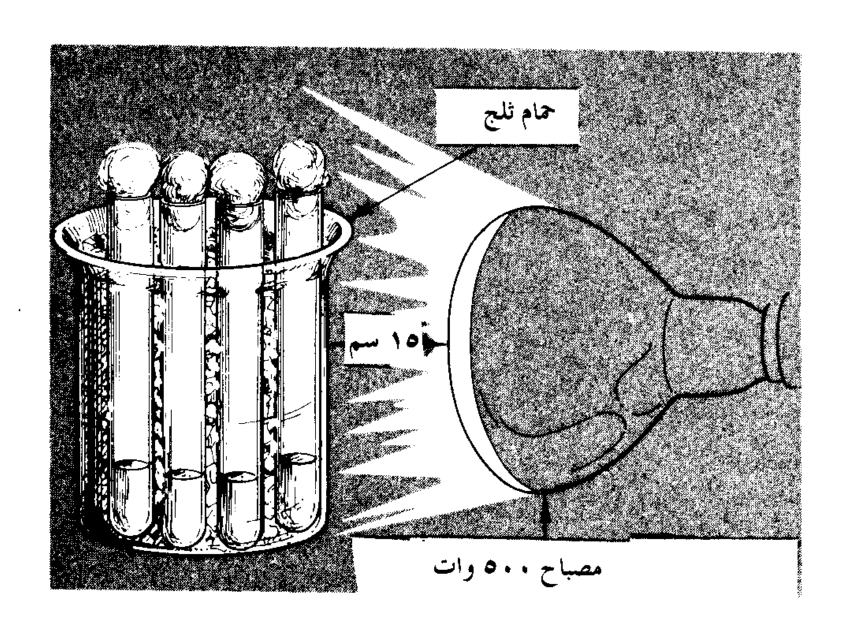
٨ – تحضن جميع الأطباق عند ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٩ – بعد انتهاء التحضين ، عد وسجل أعداد المستعمرات فى كل طبق ، واحسب نسبة الميكروبات الحية لكل من المعاملات التى عرضت للإشعاع ، وتلك التى عمل لها تنشيط ضوئى .

١٠ – ارسم العلاقة بين عدد الميكروبات الحية ، ومدة تعرض المعاملات للأشعة ، وتلك التى أجرى لها تنشيط ضوئى .



شكل (٣) : تعريض أطباق البترى للأشعة فوق البنفسجية .



شكل (٤) : التنشيط الضوئى للخلايا التى تعرضت للأشعة .

أســـئلة QUESTIONS

١ – ما هى أنواع الإشعاع الأخرى القاتلة للميكروبات ؟

٢ – هل ظاهرة التنشيط الضوئى محصورة فى الميكروبات فقط ؟

٣ – لماذا يتم رسم منحنيات أعداد الميكروبات الحية على أوراق رسم بيانى نصف لوغارتمية ؟

٤ – ما معنى ظاهرة الإصلاح فى الظلام dark repair ؟

٥ – هل يمكنك أن تحدد هل موت الميكروبات راجع لإصابة واحدة مباشرة أم لعدة إصابات ؟

تـدريـــب (٢٩)

مثبطات التمثيل : التثبيط بالسلفانيلاميد

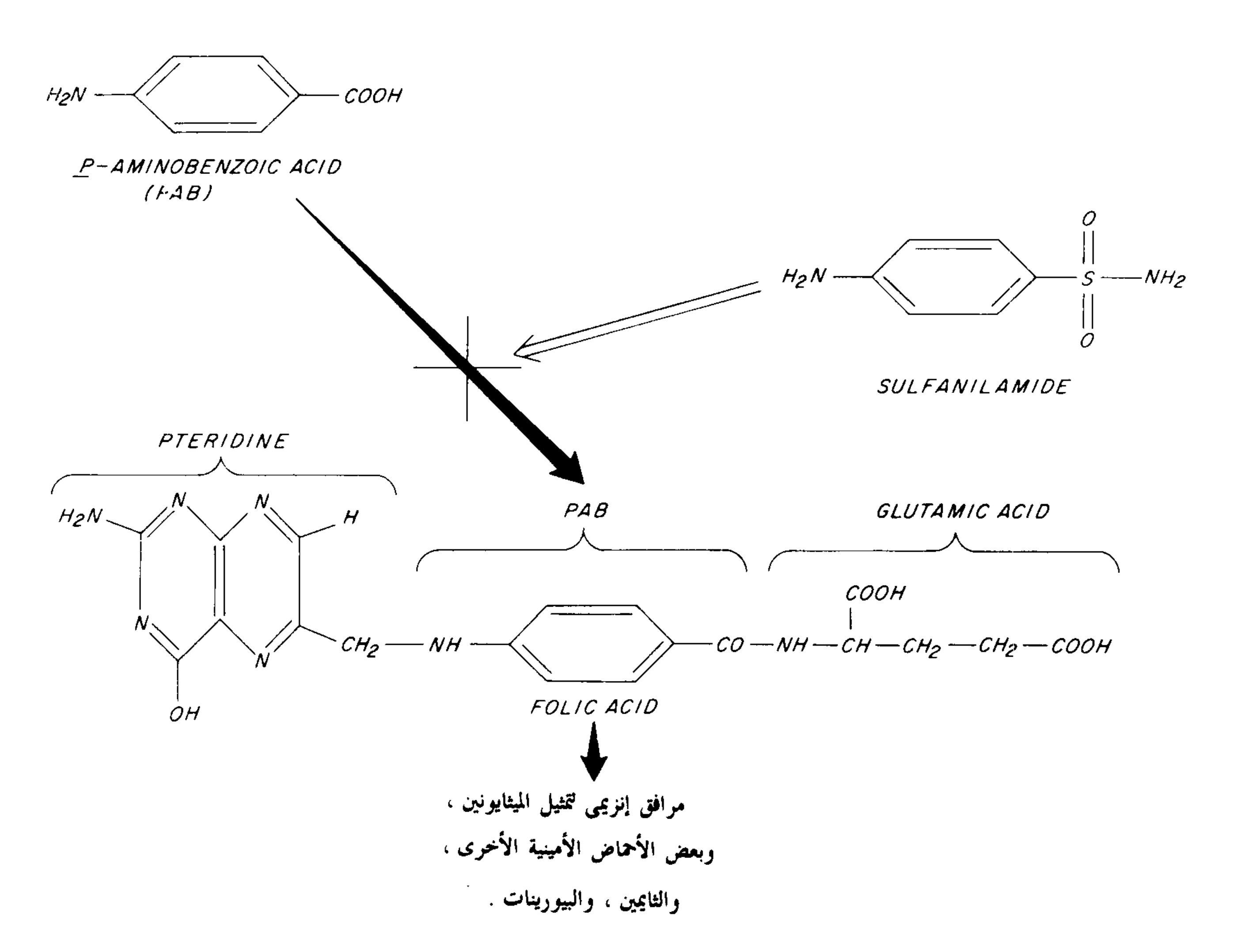
Antimetabolites: Inhibition by Sulfanilamide

توقف بعض المواد الكيميائية نمو البكتيريا ، أو تقتلها من خلال تثبيطها لنمو الخلية البكتيرية ؛ أى بتدخلها فى عملية من عمليات التكوين ، أو الاستفادة من بعض المواد الكيميائية الأساسية ، أو مركبات التمثيل الغذائى metabolites . وكثير من هذه المواد الكيميائية المثبطة ، لها تركيب يشابه تركيب مركبات التمثيل الغذائى الأساسية . وعلى هذا .. فإن هذه المواد المشابهة ترتبط بواحد ، أو

أكثر من التفاعلات الإنزيمية المطلوبة للمركب الأصلى الأساسى ، وبهذا توقف الدور الأصلى للإنزيمات . ولهذا تسمى مثل هذه المواد المثبطة الكيميائية بإسم مثبطات التمثيل الغذائى antimetabolites .

ومن بين أوائل مضادات التمثيل التى تم التعرف عليها كانت أدوية السلفا ، والتى يمثل السلفانيلاميد أحد أمثلتها . ويشابه الشكل البنائى للسلفا لحد كبير ، مركب حامض البارا‌أمينو بنزويك p- aminobenzoic ، وهو من المركبات التمثيلية الأساسية لبناء الفيتامين المسمى حامض الفوليك . ويثبط السلفانيلاميد دخول حامض البارا‌أمينوبنزويك إنزيميا فى بناء حامض الفوليك . ولذلك فإن إضافة كمية كافية من حامض امينوبنزويك يلغى التأثير المثبط للسفانيلاميد (انظر شكل ١) .

أما إضافة حامض الفوليك نفسه ، فإنها تلغى تثبيط النمو فى بعض أنواع البكتيريا فقط ، وذلك نظرًا لأن خلايا الأنواع الأخرى غير منفذة لحامض الفوليك . أما إضافة بعض نواتج التمثيل التى تتطلب لتكوينها وجود حامض الفوليك كمرافق إنزيمى ، فإنه يضاد التثبيط .



شكل (١) : طريقة عمل السلفانيلاميد .

وفى هذا التدريب العملى .. سوف تدرس تثبيط السلفانيلاميد للنمو الميكروبى ، والتأثير المضاد على هذا التثبيط لبعض النواتج التى تطلب وجود حامض الفوليك كمرافق إنزيمى لتكوينها .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - لقح البيئات التالية باستخدام ١, مل من مزرعة مغسولة من *Escherichia coli* .

(أ) بيئة الكفاف السائلة minimal broth فقط .

(ب) بيئة الكفاف + ٠١, مولر (تركيز نهائى) سلفانيلاميد .

(جـ) بيئة الكفاف + ٠١, مولر (تركيز نهائى) سلفانيلاميد + ٢ × ١٠$^{-٨}$ مولر (تركيز نهائى) حامض بارا أمينوبنزويك .

(د) بيئة الكفاف + ٠١, مولر (تركيز نهائى) سلفانيلاميد + ٢ × ١٠$^{-٧}$ مولر (تركيز نهائى) حامض باراأمينوبنزويك .

(هـ) بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد + ٧ × ١٠$^{-٥}$ مولر حامض فوليك .

(و) بيئة الكفاف + ٠٢, مولر سلفانيلاميد + النواتج التمثيلية : ل . ميثايونين (١٠$^{-٣}$ مولر) ، ثايمين (٢ × ١٠$^{-٤}$ مولر) ، سيرين (١ × ١٠$^{-٤}$ مولر) وزانسين (٧ × ١٠$^{-٥}$ مولر) .

٢ - حضن لمدة يومين على ٣٧° م .

٣ - رج الأنابيب لتوزيع النمو بانتظام ، ثم قارن النمو بالعين المجردة ، أو بجهاز قياس العكارة .

أسـئلة QUESTIONS

١ - ما معنى التثبيط التنافسى Competitive inhibition ؟

٢ - وضح عدة أمثلة لفيتامينات أخرى ، أو عوامل نمو ، ومضادات التمثيل الغذائى لها ؟

٣ - لماذا لا يتأثر الإنسان تأثيرا كبيرًا عندما يستخدم كميات معتدلة من أدوية السلفا لعلاج الأمراض ؟

الباب السابع

العلاقات المتبادلة بين الميكروبات

MICROBIAL INTERRELATIONSHIPS

تتعامل أغلب الدراسات الميكروبيولوجية المعملية مع مزارع ميكروبية نقية ، ومع التغيرات التى يحدثها نوع واحد من الميكروبات . أما فى الطبيعة .. فيندر وجود أنواع نقية منعزلة عن غيرها سواء بالنسبة للحيوانات ، أو النباتات ، أو الميكروبات .

ويعتمد بقاء ونشاط كل نوع على نشاط أنواع أخرى عديدة ، لبعضها تأثيرات مشجعة ، وبعضها منافسة ، والبعض الآخر مضادة .

وأنواع العلاقات المشجعة mutualism تتضمن العلاقة التكافلية symbiosis ، والتى فيها يرتبط نوعان أو أكثر مع بعضها ارتباطا قويا ، بحيث يعتمد كل منها على الآخر . والعلاقة التعاونية syntrophism ، والتى يوجد فيها ارتباط قوى بين النوعين ولكنه ليس إجباريًّا . أما علاقة المعايشة commensalism ففيها يستفيد أحد النوعين بينما لايتأثر الآخر .

أما العلاقات التنافسية .. فهى تتضمن التضاد الحيوى antibiosis ، وفيها ينتج أحد طرفى العلاقة مواد سامة لنوع أو أكثر . وعلاقة التطفل parasitism .. وفيها يعيش أحد الأنواع ، ويتغذى على عائل آخر ، والعلاقة الإمراضية pathogenicity وفيها يسبب الطفيل ضررا للعائل ، أما الأفتراس predation .. ففيه يقوم أفراد أحد الأنواع بمهاجمة وتحطيم أنواع أخرى .

وتعتبر دراسة هذه العلاقات والظروف البيئية التى تتم فيها ، حقل علم البيئة الميكروبية ، وهو عالم لم يتم اكتشاف أغلبه بعد .

وسوف يوضح التدريب التالى بعض العلاقات بين المجموعات الميكروبية وأيضًا مع غيرها من الأحياء الأخرى .

تـدريـــب (٣٠)

التضاد Antibiosis

تثبط بعض أنواع الميكروبات فى الوسط الطبيعى نمو غيرها . وعلاوة على إنتاج الميكروبات نواتج نهائية لأيض الكربوهيدرات (مثل الكحولات والأحماض) ، والتى تؤثر على نمو غيرها ، كذلك فإن بعضها ينتج مواد أكثر تعقيدًا ، ذات تركيب مختلف كثيرا ، تسمى المضادات الحيوية Antibiotics .

تأثير المضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility

منذ اكتشاف البنسلين ، أول المضادات الحيوية التى دخلت فى التطبيق ، اكتشفت أغلبية المضادات الحيوية مثل : الإستربتوميسين ، الكلورامفنيكول ، والأكسى تتراسيكلين ، الكلوروتتراسيكلين والأوروميسين ودخلت فى الإنتاج التجاري . وقد أدى استخدام هذه المضادات الحيوية لإيقاف نمو الكائنات المرضية فى الجسم ، إلى إنتاج سنوى ضخم من هذه المواد بواسطة شركات الأدوية . ولكى يحقق أى مضاد حيوى نجاحا طبيا ، لابد أن يحقق الشرط الآتى : أن يثبط نمو ميكروب مسبب للمرض ، وفى نفس الوقت يكون غير سام نسبيًّا للعائل .

وفى هذا التدريب سنبين إنتاج البنسلين ، وتأثيره المثبط فى المعمل .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – صب طبق من بيئة آجار اللبن التى أمامك . وبعد تصلب البيئة لقحها فى وسط الطبق بغمسة إبرة من معلق جراثيم فطر *Penicillum chrysogenum* ، وحضن الأطباق (مقلوبة) عند درجة حرارة الغرفة حتى الدرس العملى التالى ، وبعد ظهور النمو ابدأ الخطوة الثانية .

٢ – أصهر أنبوبة آجار مغذى وبردها حتى ٤٥°م ، ثم لقحها بغزارة بمزرعة *Staphylococcus aureus* وصبها فى طبق بترى معقم ، وبعد تصلب الآجار .. ضع على سطحها قطع صغيرة من الآجار (حوالى ١ سم٢) تأخذها بإبرة التلقيح من طبق فطر *Penicillium chrysogeunm* الذى سبق إعداده فى الخطوة الأولى . خذ قطع الآجار : من أطراف المستعمرة ، ومن على بعد ١ سم خارج طرف المستعمرة ، ومن طرف الطبق البترى . وإذا لاحظت وجود نقط صفراء على سطح الميسليوم الفطرى ، خذ أيضا غمسة إبرة من هذا السائل . ضع قرصاً من أقراص دراسة الحساسية للمضادات الحيوية ، يحتوى على وحدتين من البنسلين فى

منطقة أخرى من الطبق . حضن الطبق (دون أن تقلبه) عند درجة حرارة الغرفة . وبعد التحضين لاحظ مناطق التضاد .

عزل الميكروبات المنتجة للمضادات الحيوية

Isolation of an Antibiotic Producer

يستمر البحث من أجل الوصول إلى مضادات أحدث وأحسن ، فلا يوجد مضاد حيوى واحد يؤثر على جميع الميكروبات . وهناك بعض الكائنات المرضية التى لم يتم اكتشاف مضاد حيوى مؤثر عليها حتى الآن . وأغلب المضادات الحيوية تنتجها مجموعة من البكتيريا الخيطية التابعة لجنس *Streptomyces* . وهذه الميكروبات يمكن عزلها بسهولة من التربة ، وتعطى أنواع التربة المختلفة أنواعاً عديدة قادرة على إنتاج أنواع مختلفة من المضادات الحيوية .

وفى البداية .. فإنه من المطلوب أن يتم عزل أحد أنواع جنس *Streptomyces* من التربة ، بالزراعة على بيئة آجار الجلوكوز والأملاح glucose-salts agar ، والتى تضاف فيها النترات كمصدر وحيد للنيتروجين (ومضافاً إليها ميكوستاتين لتثبيط نمو الفطر) . وهذه البيئة تساعد على انتقاء ، وتنمية أفراد جنس *Streptomyces* . وبعد العزل .. تتم تغطية الأطباق التى أظهرت مستعمرات سطحية من الإستربتوميسيس بطبقة من الآجار المغذى ملقحة بمزرعة *Staphylococcus aureus* . وبعد التحضين .. تظهر الطبقة العليا الملقحة معقمة نتيجة لنمو البكتيريا ، فيما عدا المناطق التى تعلو مستعمرات *Streptomyces* التى تنتج مضادات حيوية مؤثرة على *Staphylococcus aureus* . وهذه المستعمرات المنتجة للمضادات الحيوية يتم عزلها ، وتقدر كفاءة المضاد الحيوى الناتج بالنسبة لأثره على مجموعة من الميكروبات لتقدير مدى فاعليته .

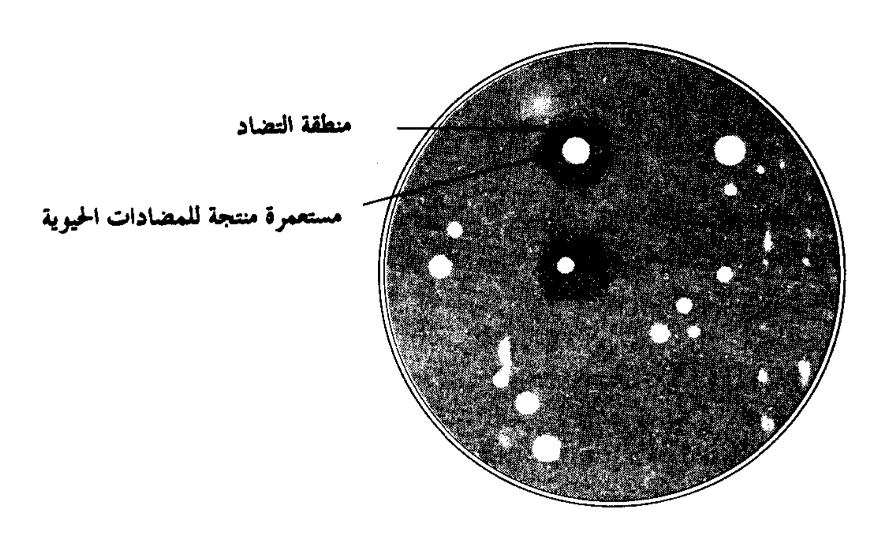
طريقة العمل PROCEDURE

١ - صب ثلاثة أطباق من بيئة آجار الجلوكوز ، والنترات ، والأملاح .

٢ - ضع على سطح الأطباق ، ١ × ١٠$^{-٥}$ ، ١ × ١٠$^{-٤}$ ، ٥ × ١٠$^{-٤}$ من تخفيفات عينة تربة ، بالطريقة التى يوضحها لك مشرف الدرس العملى . حضن الأطباق على ٣٠° م لمدة ٢ - ٤ أيام .

٣ - عندما تلاحظ تكونا واضحا للمستعمرات ، لقح ٣ مل من آجار مغذى بعد إسالته ، وتبريده بغمسة إبرة من مزرعة *Staphylococcus aureus* ، ثم صبها باحتراس فوق طبق الإستربتوميسيس ، وحضن على ٣٧° م .

٤ – لاحظ ظهور مناطق رائقة من نمو *S.aureus* حول بعض المستعمرات فى أطباق الإستربتوميسيس (انظر شكل ١) . من مستعمرات الإستربتوميسيس التى أظهرت مناطق تضاد ، خطط أطباقاً من آجار الجلوكوز ومستخلص الخميرة فى جانب واحد من الأطباق . حضن عند ٣٠° م .



شكل (١) : تثبيط نمو *S. aureus* بواسطة ميكروب منتج للمضادات الحيوية .

٥ – لتقدير التثبيط النسبى للنمو للميكروب المنتج للمضاد الحيوى ضد عدد من البكتيريا ، ولتقدير المدى المؤثر له spectrum على مختلف الميكروبات ، خطط الاربع مزارع البكتيرية المختلفة التى أمامك تخطيطا عموديًا على نمو الإستربتوميسيس . مع بدء كل عملية تلقيح من جهة نمو سلالات الإستربتوميسيس ثم التخطيط للخارج .. حضن الأطباق على ٣٧° م لمدة يومين . ستلاحظ أن ميكروبات الاختبار الحساسة للمضاد الحيوى ، لا تستطيع النمو فى منطقة نمو الإستربتوميسيس – لاحظ أيًا من المزارع البكتيرية تم تثبيطها ، وقس طول المنطقة الخالية من نمو المزارع الحساسة ، كدليل لمعرفة حساسيتها للمضاد الحيوى .

أســـئلة QUESTIONS

١ – ماهى المجموعات الميكروبية خلاف الفطريات ، التى لها أهمية فى الإنتاج التجارى للمضادات الحيوية ؟

٢ – ما هى الشروط الواجب توافرها فى المضاد الحيوى الصالح للاستخدام الطبى ؟

٣ – ما هى الاختبارات الأخرى التى يجب إجراؤها قبل استخدام المضاد الحيوى الخاص بك للأغراض الطبية ؟

تدريـــب (٣١)

التكافل Symbiosis

قد لا تؤدى العلاقة التكافلية بين نوعين من الأحياء إلى أى تغيير فى تركيب الشريكين ، ولكنها فى أحوال أخرى قد يصحبها تغيير كبير . ومثالاً للعلاقة التكافلية التى لا يحدث فيها تغير فى تركيب الكفيلين .. ما نشاهده فى بعض الحشرات التى تعتمد فى استخلاص المواد الغذائية من الأخشاب على مجموعة ميكروبية فى قناتها الهضمية . فالحشرات التى تفتقد الإنزيمات اللازمة لهضم السليولوز تعمل كعائل لميكروبات منتجة لهذه الإنزيمات ، وكلا الكفيلين يستفيد من هذه المشاركة . ولا يحتاج هذا التكافل إلى تراكيب خاصة (انظر أيضًا التكافل فى الأشن Lichen الذى سيناقش فيما بعد) .

ويحتوى كرش البقرة (أحد المعدات الأربعة للحيوان) على مجموعة ميكروبية ضخمة . وفى مقابل حصول هذه الميكروبات على موطن مريح ، ورقم هيدروجينى ، ودرجة حرارة مناسبة ، وإمداد مستمر من الغذاء .. فإنها تحلل مواد الغذاء المعقدة ، التى تأكلها البقرة ، إلى مواد يمكن للعائل أن يمثلها بسهولة . ومن المحتمل أن الكرش الذى لا يفرز بنفسه أى إنزيمات ، قد تكوّن من خلال التطور كتركيب ناجح للمساعدة فى العلاقة التكافلية بين العائل والميكروبات .

وتعتبر العلاقة بين الطحالب ، والفطريات من بين العلاقات التكافلية الواسعة الانتشار فى الطبيعة . فكلا الميكروبين ينموان مع بعضهما ليكونا معا تركيباً بنائيًا واحدًا يعتبر بديلاً لتركيب كل من الفطر ، والطحلب ، وهو ما يسمى بالأشن lichen (انظر شكل ١) . وقد يكوّن الأشن تركيبا تكاثريًا خاصا لايشابه صفات كلا المتكافلين عندما ينمو منفردًا . ويعيش الأشن ملتصقا على سطوح الصخور والأشجار . ويقوم الطحلب بتصنيع الغذاء الذى يمتصه الفطر ، بينما يحمى الفطر الطحلب الحساس من الجفاف بقيامه بامتصاص الماء من مصادر مختلفة ، والرطوبة من الهواء . وباستخدام طرق خاصة مناسبة يمكن فصل المتكافلين عن بعضهما وعندما نجد كلًّا منهما منفردا يصبح له الشكل الأصلى المميز .

وسوف تقوم فى هذه التجربة بفحص التركيب المميز للأشن ، وتقارنه بالتركيب المميز للمتكافلين .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – من مزرعتى الفطر التابع للفطريات الاسكية Ascomycetes ، والطحلب التابع للـ Chlorophyceae ، أو Myxophyceae التى أمامك ، اعمل تحضيرًا رطبا ، وافحص الشكل العام للخلايا وتركيبها .

٢ – من عينة الأشن التى أمامك .. فصص جزءًا صغيرًا بإبرة التفصيص ، واعمل تحضيرًا مبتلاً .

٣ – ارسم كل من الثلاثة التحضيرات السابقة .

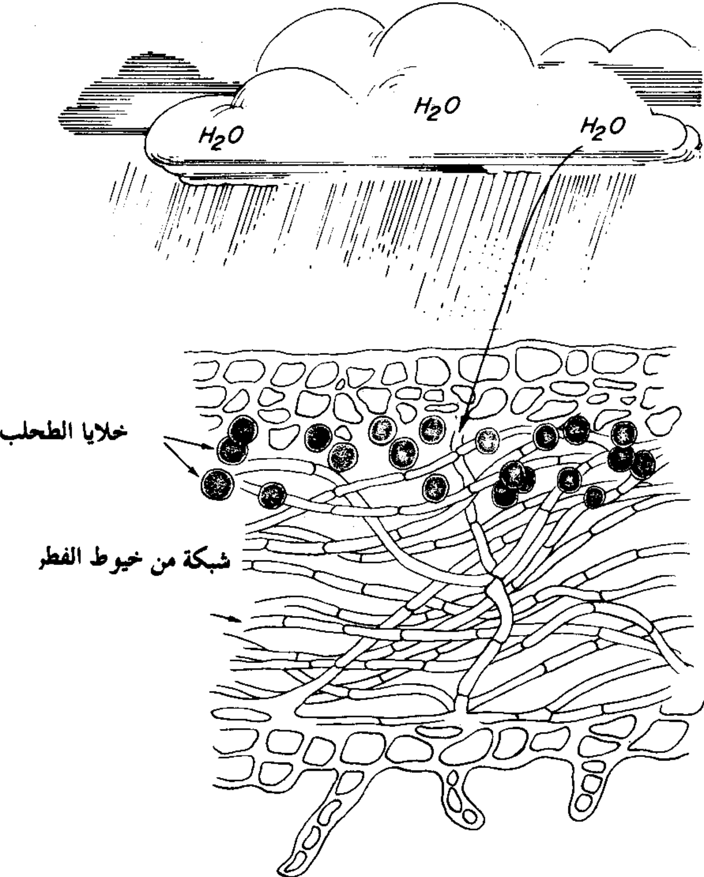
أسـئلة QUESTIONS

١ – هل يمكنك أن تميز تحت الميكرسكوب الخلايا الخاصة لكل من المتكافلين فى تركيب الأشن ؟

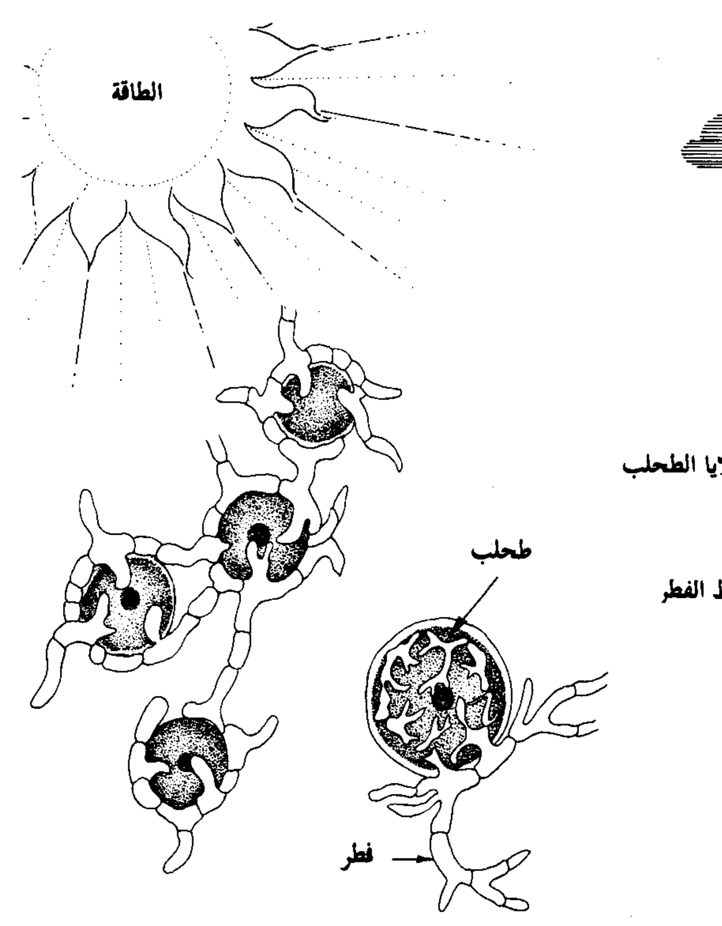
٢ – هل الفطر أم الطحلب هو الذى يكون الجزء الأكبر من جسم الأشن ؟

ملحـوظة

انظر تدريب (٧٤) فى دورة النيتروجين للحصول على نموذج آخر للعلاقة التكافلية التى تحدث فيها تغيرات تركيبية .



تقوم خلايا الفطريات باصطياد الرطوبة وتحويلها إلى صورة مناسبة للطحلب



تقوم خلايا الطحلب بتصنيع الغذاء من خلال التمثيل الضوئى وتمنحه للفطر

شكل (١) : الأشن .

تـدريـــب (٣٢)

عمود فينوجرادسكى Winogradsky Column

لكى تفهم بوضوح أكثر دور الانتخاب والإكثار فى علم البيئة الميكروبية .. عليك أن تدرس الفعل المعقد المتداخل بين الظروف البيئية ، والنشاط الميكروبى . وسوف يتبين لك أن وجود اختلاف بسيط فى ظروف متماثلة فى أغلب الصفات ، يؤدى إلى ميزة انتخابية لنوع معين فى المجموعة الميكروبية . ويعتبر عمود فينوجرادسكى نظامًا بيئيًا صغيرا ، يمكننا فيه أن نشجع العمليات الميكروبيولوجية ، مثل تلك التى تحدث فى مياه أو طين بركة (انظر شكل ١) . وعمود فينوجرادسكى ببساطة عبارة عن وعاء شفاف ، أو أسطوانة مملوءة بالطين ، أو بالورق المطحون ، أو ببودرة السليولوز (كمصدر للطاقة والكربوهيدرات) ، وأملاح الكبريتات ، والكربونات ، والفوسفات ، والماء . وعندما يتم إغلاقه وتعريضه للضوء .. يحدث فيه تتابع ميكروبى طبقا لكمية الأكسجين والضوء المتوفرين فى المناطق المختلفة من العمود . وإذا كانت كمية لقاح العمود (الطين) فى البداية ، تحتوى على مجموعة ميكروبية مناسبة .. فإن العمود سوف يثرى بالميكروبات الممثلة للضوء ، وبكتيريا الكبريت غير الملونة ، وعديد من الأنواع الميكروبية الأخرى .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – اجمع عينة من الماء والطين من بركة أو بحيرة . تخلص من الأحجار ، والحبيبات الكبيرة .

٢ – املأ أنبوبة اختبار – ذات غطاء محو (قلاووظ) ٢٥ × ٢٠٠ مم – بكمية تعادل ٧٥ مم من معجون ورق التواليت أو ورق الترشيح المطحون .

٣ – اخلط فى كأس حوالى ١٠٠ جرام من الطين مع ١ جرام من كل من كبريتات الكالسيوم وكربونات الكالسيوم ، وفوسفات ثنائى البوتاسيوم . وبعد الخلط صب حوالى ١٠٠ مم من هذا المعجون فى أنبوبة الاختبار .

٤ – باستخدام قضيب زجاجى سميك ، اضغط العمود بحيث تختفى الفراغات الهوائية منه . وأثناء ملء العمود ، وضغطه ضف ماء بكميات صغيرة (من المفضل أن يكون من نفس ماء البركة) ، ليحل محل الهواء المحبوس داخل الطين . وبعد ملء العمود ضف حوالى ٢٠ مم ماء (يفضل ماء البركة) ليغطى محتوى العمود ، ثم احكم الغطاء على الأنبوبة لمنع البخر .

٥ – غط العمود بورق الألومنيوم (لمنع نمو الطحالب) ، حضنه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢ – ٣ أسابيع .

٦ – قم بإزالة ورق الألومنيوم ، ثم حضن العمود قرب مصدر ضوئى لعدة أسابيع .

٧ – افحص على فترات التغيرات التى تحدث فى العمود أثناء فترة التحضين . ابحث عن ظهور بقع خضراء ، أو بنية ، أو حمراء ، وحدد موقعها فى العمود .

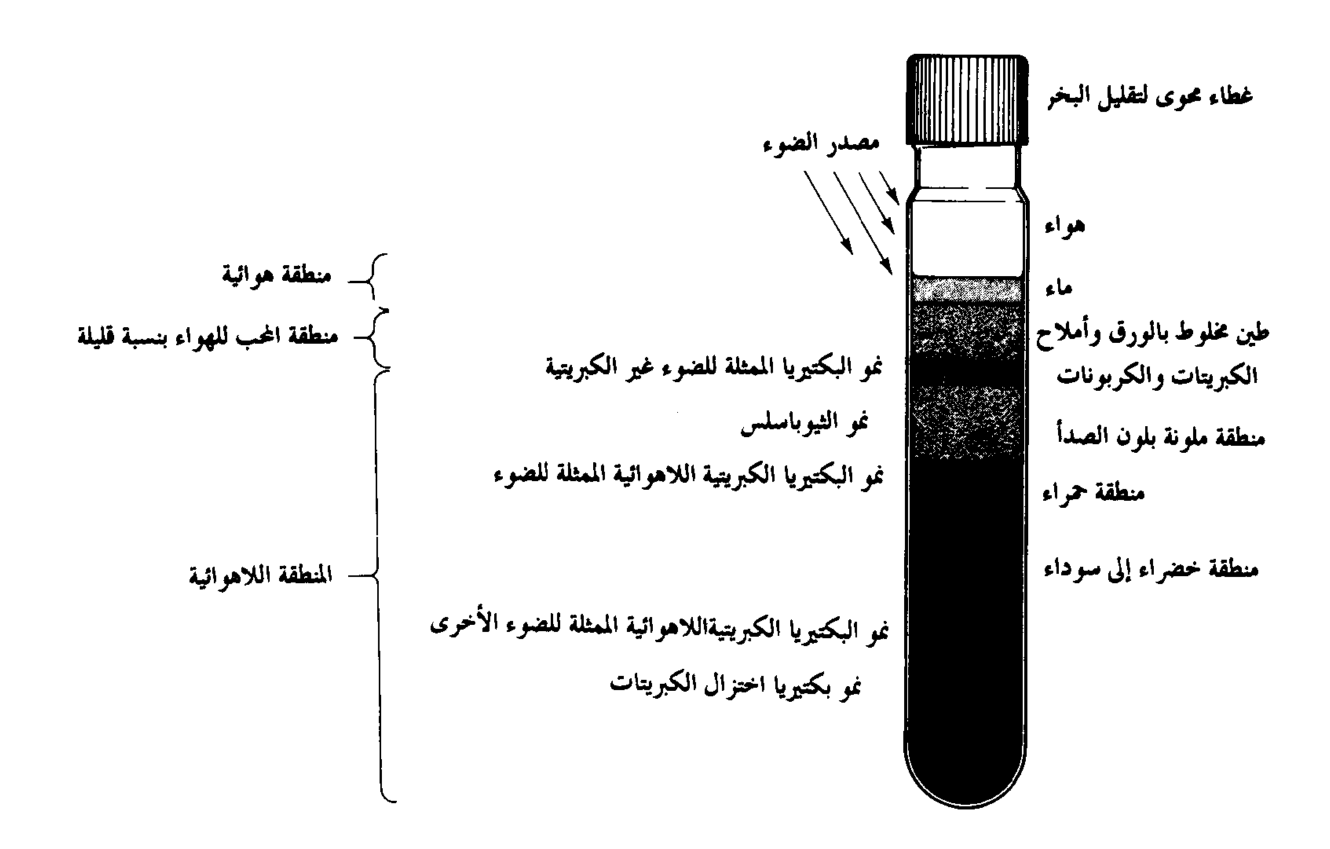
٨ – عند انتهاء فترة التحضين .. استخدم ماصة باستير للحصول على عينات من العمود على مستويات مختلفة . وبعد أخذ العينات .. ضع نقطة من العينة على شريحة ، وافحصها ميكروسكوبيا فى تحضير رطب .

من بين الميكروبات التى ستشاهدها فى العمود ما يلى :

(أ) بكتيريا هوائية مؤكسدة للكبريت مثل : *Thiothrix, Beggiatoa* .

(ب) ميكروبات مختزلة للكبريتات مثل : *Desulfovibrio* .

(جـ) بكتيريا مؤكسدة للكبريت ، ومنتجة لحامض الكبريتيك ، والثيوكبريتات مثل : *Thiobacillus* .



شكل (١) : عمود فينوجرادسكى .

(د) بكتيريا حمراء مؤكسدة للكبريتيدات ، وهى بكتيريا لاهوائية ، تنمو فى وجود الضوء مثل : *Chromatium* .

(هـ) بكتيريا لاهوائية مؤكسدة للكبريتيدات ممثلة للضوء مثل *Chlorobium* .

ويمكن بالفحص الميكروسكوبى تمييز بكتيريا الكبريت الأرجوانية بتراكم حبيبات الكبريت داخل خلاياها . أما البكتيريا غير الكبريتية والبكتيريا الخضراء .. فإنها تشبه فى شكلها البكتيريا الحلزونية وبكتيريا السيدوموناس .

٩ – بعد الفحص المجهرى ، وبالعين المجردة .. قد ترغب فى عزل أنواع من البكتيريا الممثلة للضوء . ويمكن فى هذه الحالة استخدام بيئة الأساس الموضحة فى جدول (١) ، بعد إمدادها بالمادة الغذائية العضوية ، أو غير العضوية التى تحتاجها المجموعة الميكروبية المطلوب عزلها .

جدول (١) : بيئات الإكثار ، والظروف المناسبة لعزل البكتيريا الممثلة للضوء .

إضافات للبيئة		الصفات الخاصة بالوسط		الميكروبات التى يتم إكثارها
عضوية	غير عضوية	الجو	الرقم الهيدروجينى	
لا يوجد	لا يوجد	هواء ، أو هواء + $0.5\%\ CO_2$	٦,٠ – ٨,٠	البكتيريا الخضراء المزرقة
لا يوجد	$NH_4\ Cl_3$ 1.0; $Na_2\ S.9\ H_2O$, 2.0; $NaHCO_3$, 5.0	لا يوجد (الغطاء محكم)	٧,٥	بكتيريا الكبريت الخضراء
لا يوجد	NH_4Cl, 1.0; $Na_2S.9\ H_2O$, 2.0; $NaHCO_3$, 5.0	لا يوجد (الغطاء محكم)	٨,– – ٨,٥	بكتيريا الكبريت الأرجوانية
مالات صوديوم 5.0 مستخلص خميرة 0.5	NaH_4Cl, 1.0	لايوجد (الغطاء محكم)	٧,– – ٧,٥	البكتيريا الأرجوانية غير الكبريتية

مكونات البيئة المذكورة بالجرام لكل لتر .

مكونات بيئة الأساس : $MgSO_4$. 7H, 0.2; K_2HPO_4, 1.0; $FeSO_4$. $7H_2O$, 0.01; $CaCl_2$, 0.02; $MnCl_2$. $4H_2O$, 0.002; Na Mo O_4. $2H_2$ O, 0.001; NaCl, 0.5.

الظروف المحيطة : إضافة مستمرة ، ودرجة حرارة ٢٥ – ٣٠° م .

أســــئلة QUESTIONS

١ – كيف تؤثر كل من المواد الكيميائية الثلاثة – المضافة فى الخطوة ٣ – على عمود فينوجرادسكى ؟

٢ – إذا لم تتم تغطية العمود بورق الألومنيوم ، ماذا نتوقع عن طبيعة المجموعة الميكروبية الناتجة ؟

٣ – لماذا يلاحظ انخفاض تركيز كبريتور الهيدروجين قرب سطح العمود ؟

٤ – ما هى أجناس الميكروبات التى يُحتمل أن تسود على السطح ؟

الباب الثامن

التفاعلات الإنزيمية

ENZYMATIC REACTIONS

يمكن للميكروبات مثل غيرها من الأحياء ، أن تعدّل الوسط الذى تعيش فيه لحد ما ، وتحصل على المواد الكيميائية فى صورة محلول كمصادر للطاقة ، وكأحجار بناء للنمو ، والتكاثر . وكل الأنشطة فى الخلية تحكمها الإنزيمات ، وتستخدم التفاعلات الكيميائية المعقدة فى الميكروب الحى ، عدداً كبيراً من الإنزيمات ترتبط أنشطتها ببعضها . وقد يكون من الممكن تقدير الناتج الكيميائى النهائى لبعض التفاعلات الإنزيمية ، وفى أحوال معينة .. يمكن تتبع معدل اختفاء مواد معينة من البيئة . ويمكن باستخدام سلسلة من الاختبارات المختلفة ، معرفة نوع النشاط الذى يقوم به الميكروب (والذى بالتالى يحدد التركيب الإنزيمى للميكروب) ، ويساعد هذا التحديد فى تعريف وتمييز الميكروبات عن بعضها .

المواد الكربوهيدراتية CARBOHYDRATES

تستخدم أغلب الميكروبات – مثلها مثل الإنسان – عديداً من المواد الكربوهيدراتية كمصادر رئيسية للحصول على الطاقة . وهذه تتضمن : السكريات المعقدة polysaccharides (كربوهيدرات معقدة) ، والسكريات الثنائية disaccharides ، والسكريات الأحادية monosaccharides .

ويضم جدول (٨ – ١) عدداً من هذه الكربوهيدرات وبعض المواد الأخرى التى تستخدمها الميكروبات .

جدول (٨ - ١) : أنواع المواد الكربوهيدراتية .

السكريات الأحادية	السكريات الثنائية $C_{12}H_{22}O_{11}$	السكريات الثلاثية $C_{18}H_{32}O_{16}$	السكريات المعقدة
السكريات السداسية ($C_6H_{12}O_6$)	مالتوز	رافينوز	معقد السكريات السداسية
	سكروز	مليزيتوز	$(C_6H_{10}O_5)_n$
الجلوكوز (دكستروز)	لاكتوز		نشا
الفراكتوز (ليفيلوز)	سللوبيوز		انيولين
جلاكتوز	مليبيوز		دكسترين
مانوز			جلايكوجين
سربوز			جلاكتان
			سليولوز
السكريات الخماسية ($C_5H_{10}O_5$)			معقد السكريات الخماسية
ارابينوز			$(C_5H_8O_4)_n$
زيلوز			ارابان
رامنوز ($C_6H_{12}O_5$)			زيلان
الكحولات العديدة			
مانيتول			
جلسرول			جليكوزيدات
ادونيتول			ساليسين
دلسيتول			امجدالين
سربيتول			اسكيولين

وتستطيع بعض الميكروبات أن تخمر مدى واسعًا من هذه المواد ، بينما البعض الآخر يخمر عددًا قليلاً منها . وتختلف الميكروبات أيضًا فى الطريقة التى يتم بها تحليل نوع ما من الكربوهيدرات . وحسب النوع الميكروبى تختلف النواتج النهائية المتكونة ، ومنها الأحماض العضوية (لاكتيك ، خليك ، بيوتريك ، بروبيونيك) ، ومنها النواتج المتعادلة (أسيتون ، كحول بيوتيل ، كحول إيثايل) ، وعدد من الغازات (ميثان ، هيدروجين وثانى أكسيد الكربون) .

وتهدف هذه التدريبات إلى توضيح المدى الواسع لعمل الميكروبات على الكربوهيدرات ، وإلى بيان بعض الطرق المستخدمة لدراسة هذه الأنشطة .

تـدريــب (٣٣)

تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate Fermentation

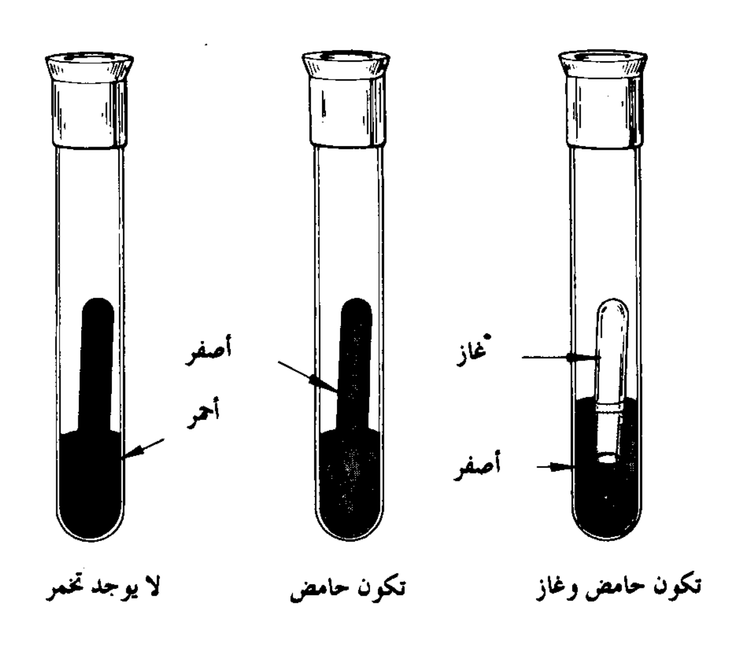
تعتبر الأحماض العضوية من بين النواتج المعروفة لتحلل الكربوهيدرات ، ومن بينها : أحماض اللاكتيك ، والخليك ، وتتكون أيضًا الغازات مثل : ثانى أكسيد الكربون ، والهيدروجين . ويعتمد نوع المركبات الناتجة ونسبتها إلى بعضها على نوع الميكروب ، ونوع المادة الكربوهيدراتية المتحللة . وعلى هذا .. فإن قدرة ميكروب ما على تحليل سكر معين ، ومجموعة من السكريات ، أو مواد كربوهيدراتية أخرى تضاف للبيئة ، تمدنا بمعلومات هامة فى تقسيم الأنواع البكتيرية . والسهولة التى يمكن بها معرفة تكون الحامض ، والغاز من مختلف الكربوهيدرات بواسطة ميكروب ما لها أهمية تطبيقية كبيرة .

ويمكنك بسهولة التأكد من تكون الأحماض ، بإضافة دليل حساس للتغير فى الرقم الهيدروجينى فى بيئة النمو . وأكثر الدلائل استعمالاً الفينول الأحمر phenol red ، الذى يعطى لونًا أحمر عند pH ٦,٩ . أما تكون الغاز فى بيئة المرق السائلة .. فيمكن معرفته بوضع طبقة من الفاسبار فوق البيئة ، أو بوضع أنبوبة مقلوبة داخلها (أنبوبة درهام Durham tube) . اما تكون الغاز فى بيئات الآجار .. فإنه يكون مصحوبا بتكون فقاعات غازية تُحدث تشققا فى طبقة الآجار .

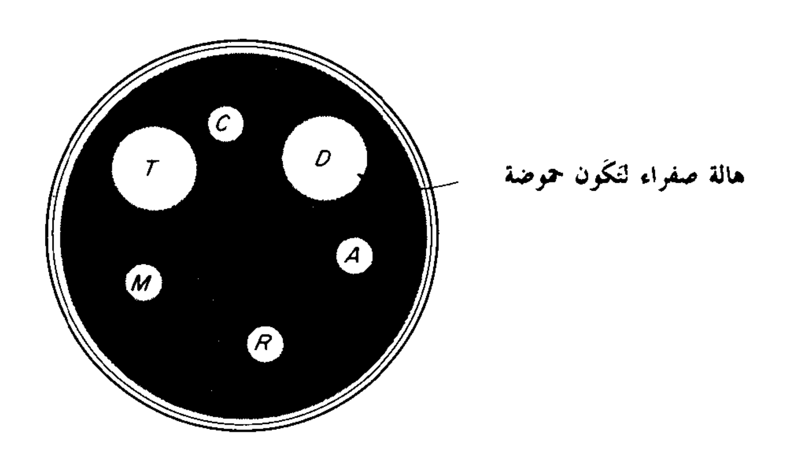
ولا تقوم بعض الميكروبات بتخمير الكربوهيدرات ولكنها تمثلها بالأكسدة ، وفى مثل هذه الميكروبات .. فإن تكون الحامض أثناء تحلل الكربوهيدرات يتم فقط تحت الظروف الهوائية . وعند نمو هذه الميكروبات فى أنابيب الآجار .. فإن الحامض يتكون فقط على سطح الآجار ، ولا يتكون بتاتا إذا تمت تغطية الآجار بطبقة من زيت معدنى ، أو فاسبار . وإذا تكون حامض فى مزرعة نامية فى أنبوبة آجار مغطاة فإن ذلك يعنى حدوث تخمر . ولتحديد نوع التغير فى الكربوهيدرات هل هو تخمر أم أكسدة ، أهمية كبيرة فى تعريف بعض أنواع العصويات السالبة لصبغة جرام مثل : أنواع السيدومونادات Pseudomonads (انظر تدريب ٤٨) .

يوضح التدريب التالى بعض الطرق البسيطة ، التى يمكنك استخدامها لدراسة تكون الحامض والغاز من تحلل الكربوهيدرات . ففى الطريقة (أ) تستخدم بيئة سائلة تحتوى على أحمر الفينول كدليل للحموضة ، للتأكد من تكون الحامض ، وأنبوبة مقلوبة ، أو غطاء من الفاسبار لدراسة تكون الغاز (انظر شكل ١) .

أما فى الطريقة (ب) .. فتستخدم أقراص مشبعة بالكربوهيدرات المطلوب دراستها ، حيث توضع هذه الأقراص على سطح أطباق بيئة أحمر الفينول التى سبق تلقيحها بالميكروب المدروس . وينتشر السكر من القرص فى الآجار المحيط به ، ويمكن ملاحظة تخمر السكر بتكون هالة صفراء حول القرص (انظر شكل ٢) .



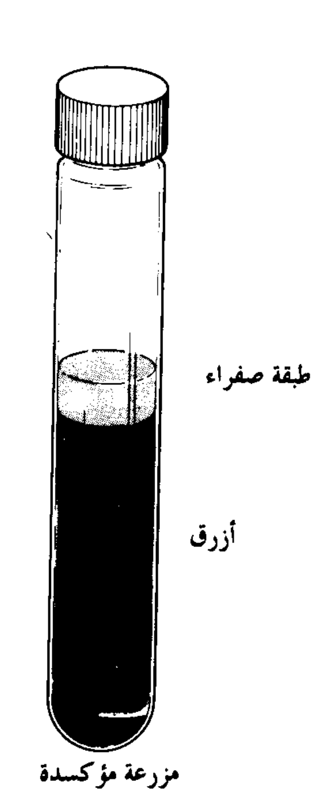
شكل (١) : التفاعلات الممكن حدوثها فى أنابيب بيئة أحمر الفينول .

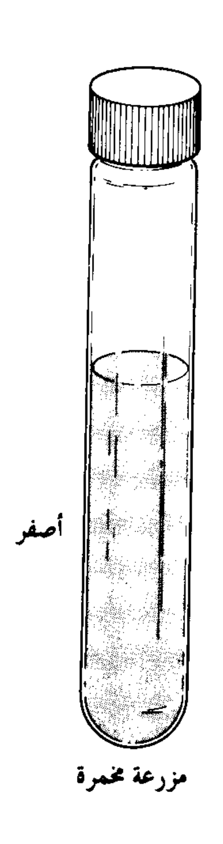


شكل (٢) : طريقة الأقراص لتقدير تخمر الكربوهيدرات .
الحروف توضح نوع المادة الكربوهيدراتية .

تمثل الطريقة (جـ) طريقة ، لبيان هل استهلاك الكربوهيدرات يتم بالأكسدة أم بالتخمر ، وتستخدم فيها بيئة آجار OF (Oxidation Fermentation) تحتوى على السكر المطلوب ، وبروم ثيمول بلو كدليل للحموضة ، حيث يعطى هذا الدليل لونا قرمزيا عند pH ٦,٨ وأصفر عند pH ٥,٢ . يتم تلقيح أنبوبتين من بيئة آجار (OF) بالوخز (حتى قاع الأنبوبة) باستخدام إبرة التلقيح المستقيمة . وتتم تغطية أحدى الأنبوبتين الملقحتين (أنبوبة التخمر) بطبقة من الفاسبار . فإذا كانت المزرعة من النوع المخمر .. فإن كلتا أنبوبتى بيئة آجار (OF) ، سوف تتحول إلى اللون الأصفر . أما إذا كانت

المزرعة من النوع المؤكسد ، فسوف يتحول أيون الطبقة السطحية – لبضعة سنتيمترات فقط ف الأنبوبة غير المغطاة – إلى اللون الأصفر . وفى بعض المزارع المؤكسدة لايلاحظ تكون نواتج حامضية نهائية (انظر شكل ٣) .





شكل (٣) : أنابيب الأكسدة والاختزال .

الطريقة (أ)

١ – أمامك أربع أنابيب من كل من البيئات الآتية :

(أ) مرق الجلوكوز وأحمر الفينول المحتوية على أنبوبة درهام .
(ب) مرق السكروز وأحمر الفينول المحتوية على أنبوبة درهام .
(جـ) مرق اللاكتوز وأحمر الفينول المحتوية على أنبوبة درهام .

لقح أنبوبة من كل بيئة بإحدى المزارع *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Streptococcus faecalis* واترك الأنبوبة الرابعة بدون تلقيح كمقارنة .

ملحوظة : تأكد من كتابة البيانات على كل أنبوبة ، وتغطية كل أنبوبة بالغطاء الخاص بها .

٢ – باستخدام مزرعة *Escherichia coli* التى أمامك ، لقح أنبوبة من بيئة مرق الجلوكوز وأحمر الفينول ، وغط البيئة بطبقة من الفاسبار .

٣ – فى الدرس العملى التالى .. افحص الانابيب لتكون الحامض والغاز ، وسجل النتائج فى صفحة التقرير .

الطريقة (ب)

١ – لقح أطباق آجار أحمر الفينول بكل من مزارع *Escherichia coli* ، *Enterobacter aerogenes* ، *Proteus vulgaris* ، *Pseudomonas aeruginosa* . انشر اللقاح على سطح كل طبق ، باستخدام إما مرود swab معقم ، أو قضيب زجاج منثن (معقم) من النوع المستخدم لتوزيع اللقاح على الطبق .

٢ – باستخدام ملقط معقم باللهب ، وزع ستة أقراص كربوهيدرات بانتظام على سطح الآجار فى الطبق .

٣ – حضن الأطباق لمدة (١٨ – ٢٤) ساعة عند ٣٧° م فى وضع معتدل لدراسة تخمر الكربوهيدرات . افحص أقراص الكربوهيدرات فى كل طبق لتغير لون أحمر الفينول إلى اللون الأصفر . وسجل النتائج فى جدول فى صفحة التقرير .

٤ – اعد التحضين ، ثم افحص بعد ٤٨ ساعة ، وهذه الفترة الثانية ضرورية حيث إن الميكروبات المختلفة لاتخمر الكربوهيدرات بنفس السرعة ، وعلاوة على ذلك .. فإن نتائج تخمر الكربوهيدرات الإيجابية قد تختفى عند حدوث أكسدة للنواتج الحامضية فيما بعد ، وعلى هذا فإن ميكروبًا ما قد يُظهر تخمرًا للكربوهيدرات بتغير اللون بعد ٢٤ ساعة ، ثم يعطى نتيجة عكسية (تفاعل قاعدى) بعد ٤٨ ساعة ، عندها قد يكون تخمر مادة كربوهيدراتية أخرى لازال فى بدايته .

الطريقة (جـ)

١ – من كل المزارع المائلة لكل من *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، لقح أنبوبتين من بيئة آجار الجلوكوز OF (بيئة التخمر والأكسدة) بالوخز بإبرة التلقيح المستقيمة .

٢ – غط أنبوبة من كل مزرعة باستخدام طبقة رقيقة من الفاسبار .

٣ – حضن لمدة ٤٨ ساعة عند ٣٧° م .

٤ – افحص لتكون الحامض والغاز من الجلوكوز ، وسجل النتائج فى صفحة التقرير . يلاحظ

أن المزارع التخمرية سوف تحول كلتا الأنبوبتين إلى اللون الأصفر ، أما المزارع المؤكسدة .. فإنها سوف تحوّل سطح الأنبوبة غير المغطاة فقط إلى اللون الأصفر .

تساعد طريقة التلقيح بالوخز فى دراسة الحركة . تظهر أنابيب آجار مزارع الوخز المتحركة ، معتمة فى كل الآجار نتيجة لتحرك الميكروب النامى فى كل البيئة ، أما المزارع غير المتحركة .. فإن النمو يكون فقط على خط الوخز .

أســـئلة QUESTIONS

١ – اذكر بعض الأحماض التى تكونها البكتيريا . واذكر أهم الأجناس المكوّنة لهذه الأحماض .

٢ – هل لنوع الحامض المتكون قيمة فى تقسيم الميكروبات ؟ وضح ذلك ؟

٣ – ماذا يعنى بالتخمر غير المختلط Homofermentative ، والتخمر المختلط Heterofermentative ؟

٤ – كيف يتم ملء أنبوبة درهام المقلوبة بالبيئة ؟

٥ – بعض الميكروبات تستخدم الكربوهيدرات دون تكون حموضة . فى هذه الحالة كيف يمكنك معرفة أن الميكروب قد استخدم الكربوهيدرات ؟

٦ – ما هو التفاعل الذى يحدث أثناء الانقلاب القاعدى عند الاستخدام التأكسدى للجلوكوز ؟

٧ – ما هى الصفة الخاصة لبيئة آجار OF التى يستفاد منها فى دراسة حركة الميكروب ؟

تـدريـــب (٣٤)

التحلل المائى للنشا Starch Hydrolysis

النشا عبارة عن : كربوهيدرات معقدة . ويتم الكشف عن النشا وصفيًّا بتكون لون أزرق مع اليود . وعندما يتم التحلل المائى للنشا تتكون نواتج تحلل هى : الدكسترينات ، المالتوز ، والجلوكوز مرتبة تنازليا حسب مدى تعقد جزيئاتها ، وهذه لا تعطى التفاعل اللونى مع اليود ، وتستخدم هذه الظاهرة فى الكشف عن تحلل النشا فى هذا التدريب .

وتعتمد قدرة الميكروب على تحلل النشا على وجود إنزيم الأميليز amylase . ولعدم قدرة كل الميكروبات على إنتاج إنزيم الأميليز .. فإن القدرة على تحليل النشا يمكن أن تستخدم فى تعريف الميكروبات .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - لقح طبقين من بيئة آجار النشا بمزارع *Escherichia coli, Bacillus subtilis* ، بغمسة إبرة فى وسط الطبق ، ولأن هذا التدريب لايهدف إلى عزل مستعمرات .. فإنه يُكتفى بالتلقيح فى وسط الطبق ، مع تجنب التخطيط حتى يمكنك ترك مساحة غير ملقحة تسمح بمقارنة اللون عند الغمر باليود .

٢ - حضن الأطباق على ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى .

٣ - اختبر القدرة الدياستيزية diastatic (القدرة على تحليل النشا) للميكروبات ، وذلك بتغطية سطح بيئة آجار النشا فى الطبق باليود . يؤكدتكوّن هالة رائقة فى منطقة نمو الميكروب ، قدرة الميكروب على تحليل النشا .

أســـئلة QUESTIONS

١ - لماذا يتم تقسيم إنزيم الأميليز ضمن إنزيمات التحلل المائى ؟

٢ - هل إنزيمات الأميليز من الإنزيمات الخارجية أم الداخلية ؟

٣ - ما هى القيمة البيئية لهذه الإنزيمات ؟

البروتينات والأحماض الأمينية PROTEINS AND AMINO ACIDS

يستطيع كثير من البكتيريا تحليل عديد من البروتينات ، وتستخدم الببتيدات والأحماض الأمينية الناتجة ، لتمثيل بروتينات الخلية وللاستخدام كمصادر للطاقة للخلية . وتختلف الميكروبات من نوع لآخر فى قدرتها على تحليل البروتينات Proteolytic ، وفى الطريقة التى يتم بها تحلل الأحماض الأمينية . يستفاد من ذلك فى تمييز أنواع الميكروبات .

تـدريـــب (٣٥)

التحلل المائى للكازين Casein Hydrolysis

الكازين هو البروتين الأساسى فى اللبن . وهو يوجد فيه كمعلق غرو يعطى للبن اللون الأبيض غير الشفاف . ويمتلك كثير من البكتيريا الإنزيمات التى تحلل هذا البروتين إلى مشتقات أكثر ذوبانًا ، وشفافية . ويسمى تحلل البروتين فى بعض الأحوال ببتنة peptonization ، وهو تفاعل مفيد فى تعريف الميكروبات .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – أمامك طبقين من آجار اللبن الخض skim milk agar .

٢ – لقح أحد الطبقين بمزرعة *Escherichia coli* ، والطبق الآخر من *Bacillus subtilis* ، وذلك بغمسة إبرة فى وسط الطبق (مثل تدريب ٣٤) .

٣ – حضن عند ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى .

تظهر مستعمرات الميكروبات القادرة على تحليل الكازين (المحللة للبروتين) محاطة بهالة رائقه ، بينما تظهر المناطق التى لم يتم فيها تحلل الكازين بيضاء معتمة . ويمكن مشاهدة الهالة الرائقة أكثر وضوحا ، عندما يوضع الطبق على خلفية سوداء .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هى النواتج التى تتكون من تحلل الكازين ؟

٢ – هل الإنزيمات المسؤولة عن تحلل الكازين إنزيمات خارجية أم داخلية ؟

تدريــب (٣٦)

التحلل المائى للجيلاتين Gelatin Hydrolysis

الجيلاتين بروتين يتم الحصول عليه بتحليل الكلاجين Collagen – أحد مكونات النسيج الضام والأوتار فى الحيوانات . ويعتبر الجيلاتين مادة مناسبة لاختبار قدرة الميكروبات على تحلل البروتين .

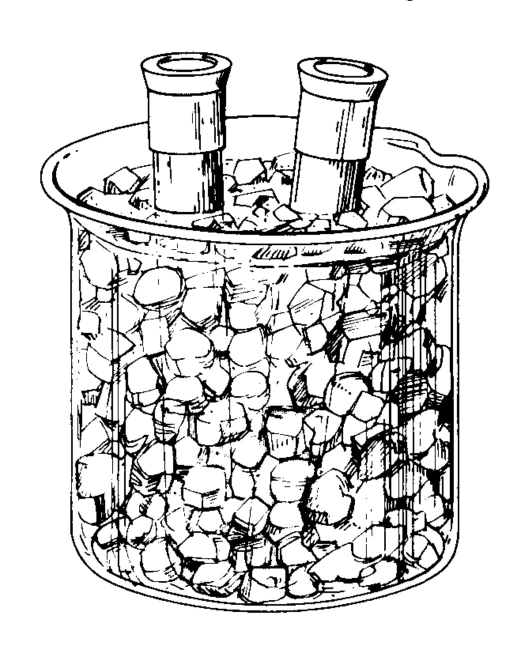
ويتميز المحلول المائى للجيلاتين – بالتركيزات المستخدمة فى البيئات فى هذا التدريب – بأنه يكون سائلا عند درجة حرارة الغرفة ، ويتصلب عند وضعه فى حمام ثلجى ، وإذا استطاع الميكروب المختبر تحليل الجيلاتين .. فإن البيئة لا تتصلب فى الحمام الثلجى .

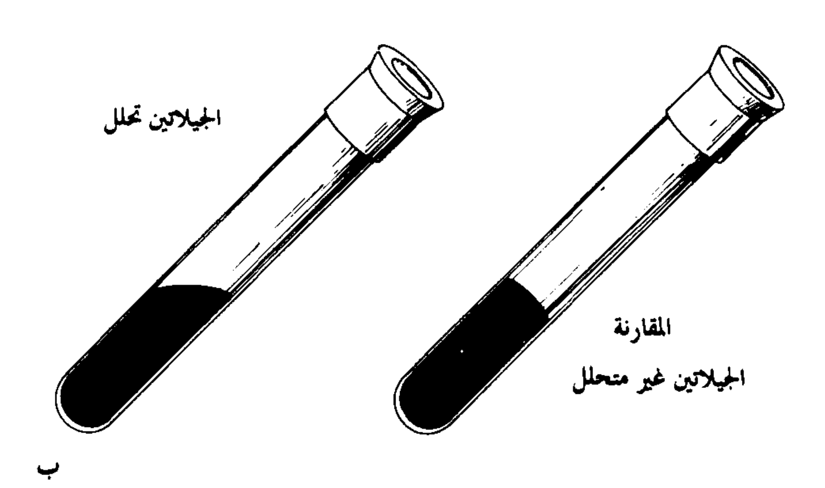
طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح أربع أنابيب جيلاتين مغذى nutrient gelatin بمزارع *Escherichia coli; Bacillus subtilis,* Streptococcus faecalis, *Proteus vulgaris* .

٢ – حضنها على ٣٧° م مع أنبوبة معقمة من الجيلاتين المغذى كأنبوبة مقارنة . وافحص الأنابيب كل يومين لمدة سبعة أيام أو حتى ظهور نتيجة إيجابية .

٣ – لاختبار تحليل الجيلاتين .. تبرد الأنابيب فى ماء مثلج ، ويلاحظ أن أنبوبة المقارنة والأنابيب التى لم يحدث فيها تحلل للجيلاتين سوف تتصلب بالتبريد ، أما الجيلاتين الذى تحلل فلا يتصلب (انظر شكل ١) .


أ



ب

شكل (١) : اختبار تحلل الجيلاتين .

أســـئلة QUESTIONS

١ – هل يمكنك أن تقترح كيف يمكن تطبيق استخدام اختبار تحلل الجيلاتين فى الأطباق ؟

٢ – فى أى شئ يختلف الجيلاتين عن البروتينات الأخرى ؟

٣ – الإنزيمات التى تحلل كل من الجيلاتين ، والكازين تفكك نفس الرابطة الكيميائية . ما هى هذه الرابطة ؟

تدريـــب (٣٧)

استخدام الأحماض الأمينية
Utilization of Amino Acids

بالرغم من أن الأحماض الأمينية ، تستخدم أساسًا كمكونات أساسية ، لكثير من البروتينات المكونة للكائنات الحية ، إلا أنها تستخدم أيضا فى الخلية لأغراض أخرى . فالأحماض الأمينية يمكن أن تحلل لإنتاج الطاقة فى الخلية ، كما أنها تعطى عديداً من نواتج التحلل منها : الأمونيا ، والإندول ، والماء . يمكن حدوث تغير للأحماض الأمينية ، لتكون مكونات أخرى هامة للخلية ، من بينها أحماض أمينية أخرى .

ويمثل التشابه الكبير فى الصفات – بين أجناس البكتيريا السالبة لصبغة جرام التابعة لعائلة البكتيريا المعوية – Enterobacteriaceae إحدى المشاكل الأساسية فى تقسيم الميكروبات . وهذه العائلة واسعة الانتشار وتتراوح من *Escherichia coli* – التى تكوّن جزءًا من المجموعة الميكروبية الطبيعية للامعاء – إلى *Salmonella typhi* المسببة للحمى التيفودية فى الإنسان . لهذا فمن المهم تعريف هذه الميكروبات بسرعة وبدقة . ويستخدم عديد من التفاعلات التى تتضمن تحلل الأحماض الأمينية فى تقسيم عائلة Enterobacteriaceae . ويضم هذا التدريب بعض هذه الاختبارات .

نزع مجموعة الكربوكسيل وإنتاج الأمين
Decarboxylation and Amine Production

إن نزع مجاميع الكربوكسيل من الحامض الأمينى عملية إنزيمية تتم فيها إزالة المجموعة الكربوكسيلية مما يؤدى إلى تكون الأمين ، CO_2 ويمكن توضيح التفاعل كما يلى :

$$\underset{\text{(حامض أمينى)}}{R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{C}H}-COOH} \xrightarrow[\text{decarboxylase}]{\text{إنزيم}} \underset{\text{(أمين)}}{R-CH_2-NH_2} + CO_2\uparrow$$

ويمكن تقدير قدرة البكتيريا على نزع الكربوكسيل ، إما بدراسة اختفاء الحامض الأمينى – وهى عملية صعبة ومعقدة – أو بدراسة تكوين الأمين ، CO_2 . ونظرًا لأن الأمين المتكوّن له تأثير قاعدى ، فإن عملية نزع مجاميع الكربوكسيل يمكن قياسها بتقدير الارتفاع فى الرقم الهيدروجينى (pH) .

PROCEDURE

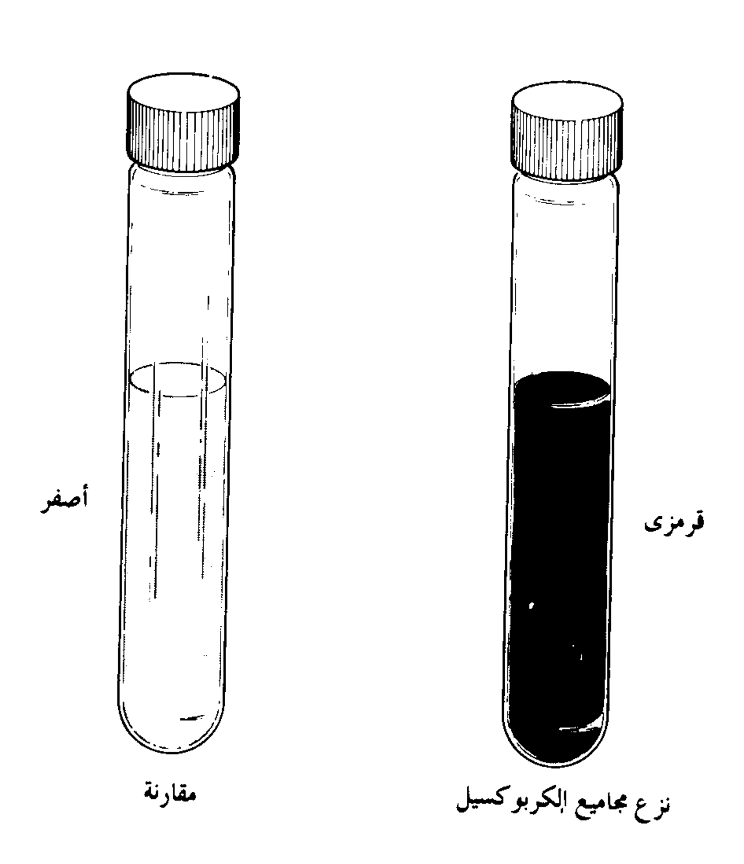
طريقة العمل

١ – تحتاج فى هذا التدريب إلى أنبوبتى بيئة مرق الليسين ديكربوكسيليز lysine decarboxylase broth ، وأنبوبتى بيئة مرق أورنيثين ديكربوكسيليز ornithine decarboxylase broth وأنبوبتى مرق ديكربوكسليز أساس decarboxylase base broth .

٢ – لقح أنبوبة من كل بيئة بمزرعة *Proteus vulgaris* ، أو بمزرعة *Enterobacter aerogenes* ، وقم بتغطية كل الأنابيب بطبقة من الفاسبار ، أو الآجار .

٣ – حضن على ٣٧° م لمدة يومين .

٤ – افحص لتكون الغاز والتغير فى الرقم الهيدروجينى . ويؤدى تغيير الرقم الهيدروجينى – إلى الناحية القاعدية نتيجة لتراكم الأمين – إلى تغير لون دليل بروم كريزول بربل الموجود فى البيئة من اللون الأصفر إلى اللون القرمزى (انظر شكل ١ ، وجدول ١) .



شكل (١) : تقدير نزع مجاميع الكربوكسيل من الليسين .

جدول (١) : نزع مجاميع الكربوكسيل والأمين من الأحماض الأمينية .

الإنـزيــــــــم	الميكـــــــروب	
	Proteus vulgaris	*Enterobacter aerogenes*
Lyisne decarboxylase	—	+
Ornithine decarboxylasè	—	+
Phenylalanine decarboxylase	+	—

وعادة .. فإن نزع مجاميع الكربوكسيل يعتبر خطوة مبدئية فى تحلل الحامض الأمينى لإمداد الخلية بطاقة ومواد غذائية أساسية . وعلاوة على ذلك .. فإنه قد يخدم الخلية برفع الرقم الهيدروجينى فى البيئة ليعادل أثر الظروف الحامضية . ولقد أمكن التعرف على إنزيمات متخصصة لنزع مجاميع الكربوكسيل من عدد من الأحماض الأمينية . وهى جميعا بدون استثناء لاتعمل إلا إذا كان الرقم الهيدروجينى للوسط أقل من ٧ . وترجع الرائحة الكريهة التى تصاحب تحلل البروتينات إلى تكوّن أمينات طيارة من بعض الأحماض الأمينية .

نزع مجاميع الأمين **Deamination**

على عكس عملية نزع مجاميع الكربوكسيل .. فإن نزع مجاميع الأمين عبارة عن فصل مجموعة الأمين إنزيميًا ، منتجا NH_3 والحامض الكيتونى المقابل ، كما يلاحظ من التفاعل التالى :

$$\underset{\text{(حامض امينى)}}{R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH} \xrightarrow[+\ H_2O]{\text{deaminase}} \underset{\text{(حامض كيتونى)}}{R-\overset{\overset{O}{/\!/}}{C}-COOH} + \underset{\text{(امونيا)}}{NH_3}$$

وفى هذا التدريب سوف يُلاحظ نزع مجاميع الأمين من الحامض الأمينى فينيل الأنين ، وذلك من خلال تكون حامض الفينيل بيروفيك ، وهو الحامض الكيتونى المقابل الذى يكون مركباً معقدًا ملونا مع أيونات الحديديك .

PROCEDURE
طريقة العمل

١ – لقح أنبوبة آجار الفينيل الأنين بمزرعة *Proteus vulgaris* وأنبوبة أخرى بمزرعة *Enterobacter aerogenes* .

٢ – حضن عند ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى .

٣ – بعد انتهاء التحضين .. اختبر الأنابيب لتكون حامض الفينيل بيروفيك ؛ وذلك بوضع ٤ – ٥ نقط من محلول ١٠٪ $Fe\,Cl_3$ على سطح الآجار المائل ، ويعتبر تكون لون أخضر دليلاً إيجابيًّا .

Indole Production
إنتاج الإندول

الإندول عبارة عن مركب يحتوى على نيتروجين ، تكوّن أثناء تحلل الحامض الأمينى تربتوفان ، بأنواع عديدة من البكتيريا . ولاختبار الإندول أهمية خاصة ، نظرًا لأن بعض أنواع البكتيريا فقط هى التى تكونه ، ومن السهل التأكد كيميائيًّا من تكونه . وعلى هذا .. فإن تحلل التربتوفان يمثل أحد الاختبارات التفريقية بين الميكروبات .

ولا يستخدم التربتوفان النقى عادة فى بيئة الاختبار ، ولكن يستخدم بدلاً منه التربتون tryptone ، وهو عبارة عن ناتج تحلل بعض البروتينات حيث يستخدم كمادة تحتوى على نسبة معقولة من التربتوفان . يمكن توضيح التفاعل الذى يتكون فيه الإندول من التربتوفان فيما يلى :

$$\text{(indole ring)}-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$$

تربتوفان

$$\downarrow + H_2O$$

$$\text{(indole)} + CH_3-\overset{\overset{O}{||}}{C}-COOH + NH_3$$

إندول   حمض بيروفيك   أمونيا

PROCEDURE طريقة العمل

١ – لقح أنبوبة من مرق التربتون (١٪) بمزرعة *Escherichia coli* ، وأنبوبة أخرى بمزرعة *Enterobacter aerogenes* .

٢ – حضن عند ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى (ولو أنه من المفضل اجراء الاختبار بعد ٢٤ ساعة) .

٣ – اختبر كل أنبوبة لتكون الإندول باستخدام طريقة كوفاكس Kovacs .

(أ) تضاف إلى المزرعة السائلة (٦ مل) ، محلول كوفاكس (٠,٣ مل) .

(ب) اخلط جيدًا بإدارة الأنبوبة بين اليدين . سوف يلاحظ انفصال طبقة كحولية فوق الطبقة المائية بعد إيقاف الرج ، ويحدث تحول للطبقة الكحولية إلى اللون الأحمر بعد بضعة دقائق فى حالة وجود الإندول .

Hydrogen Sulfide Production إنتاج كبريتيد الهيدروجين

يؤدى نشاط بعض البكتيريا على الأحماض الأمينية المحتوية على كبريت إلى تصاعد H_2S . يلاحظ المثال الشائع لذلك التفاعل فى رائحة البيض المتعفن ، وفى اسوداد بعض الأغذية المعلبة الفاسدة . وفى هذه الحالة .. فإن الاسوداد يعزى إلى التفاعل بين H_2S الذى تكونه البكتيريا ومعدن العلبة .

ويمكن ملاحظة تكوين المزارع البكتيرية لـ H_2S فى المعمل ، إذا نُميت المزرعة المنتجة للكبريتيد ، فى بيئة تحتوى على أملاح معادن مثل : البزموت ، أو الحديد ، حيث يظهر اسوداد على طول خط الوخز ناتجا عن تكون كبريتيد المعدن .

ويوضح التفاعل التالى مثالاً لتكون H_2S :

$$\underset{\text{سيستين}}{H_2N-\overset{\displaystyle CH_2-SH}{\overset{|}{C}H}-COOH} \xrightarrow{+2H} \underset{\text{كبريتيد الهيدروجين}}{H_2S} + \underset{\text{الألنين}}{H_2N-\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}H}-COOH}$$

وسوف نستخدم فى التدريب التالى بيئة الكبريتيد – الإندول والحركة - SIM medium (Sulfide - Indole - Motility) التى لا تمكننا فقط من تقدير الكبريتيد ، ولكن أيضا تكون الإندول ، والحركة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – باستخدام الإبرة اعمل وخزا (انظر شكل ٢ – ٣) ، بمزرعتى *Escherichia coli* ، *Proteus vulgaris* فى أنبوبتى بيئة SIM .

٢ – حضن الأنبوبتين على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٣ – افحص لتكون H_2S ، والحركة ولتكون الإندول . يؤكد ظهور راسب أسود من FeS تكون H_2S ، كما أن انتشار النمو بعيدًا عن خط الوخز – فى هذه البيئة نصف الصلبة – يوضح وجود الحركة ، ويؤكد تكون لون أحمر بعد إضافة محلول كوفاكس إنتاج الإندول . وتعتبر هذه البيئة مثالاً لطريقة ، يمكن بها عمل اختبار متعدد فى أنبوبة بها بيئة واحدة .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما اسم الأمين الناتج من نزع الكربوكسيل من التيروزين ؟ ومن الليسين ؟ ومن الأورنيثين ؟ .

٢ – ما هو الفيتامين التابع لمجموعة B الذى يعمل كجزء من المرافق الإنزيمى فى كثير من إنزيمات نزع مجاميع الكربوكسيل ؟

٣ – ما هو نوع التغير فى الرقم الهيدروجينى الذى يحدث مع نزع مجاميع الأمين ؟ هل التغير فى الرقم الهيدروجينى يكون عاليا بنفس الدرجة التى تحدث عند نزع مجاميع الكربوكسيل ؟ ولماذا ؟

٤ – يتفاعل التربتوفان أيضًا مع P-methylaminobenzaldehyde فى محلول كوفاكس . لماذا عندئذ يعتبر هذا الدليل مفيدًا فى الكشف عن الإندول من التربتوفان ؟

٥ – هل يمكنك الكشف عن تكون H_2S فى بيئة مناسبة ، بدراسة تكون الغاز فى أنبوبة درهام التخمرية ؟

الليبيدات LIPIDS

من بين الليبيدات التى تحللها الميكروبات عادة الجلسربدات الثلاثية triglycerides ،

والفوسفوليبيدات Phospholipids . والجلسريدات الثلاثية عبارة عن أسترات للجلسرول والأحماض الدهنية . والتفاعل المرتبط بهذا التحلل يحدث كما يلي :

$$\begin{matrix} CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R \\ | \\ CH-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R' \\ | \\ CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R'' \end{matrix} \xrightarrow[\text{lipase}]{+\ 3\ H_2O} \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} + \begin{matrix} RCOOH \\ \\ R'COOH \\ \\ R''COOH \end{matrix}$$

جلسريد ثلاثي — جلسرول — حامض دهني من ثلاث جزيئات

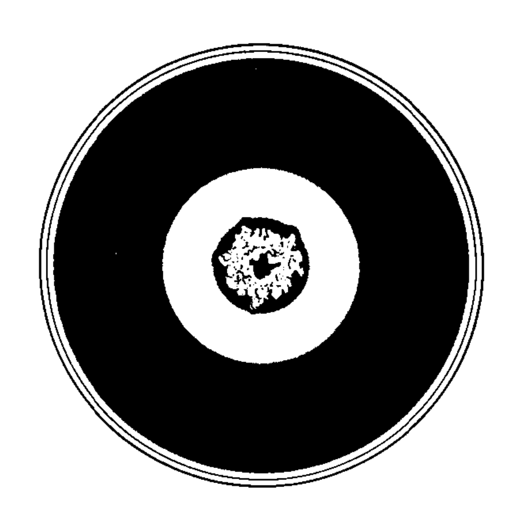
وقد تؤدى قدرة الميكروبات على تحليل الجلسريدات الثلاثية ، إلى حدوث تزنخ لبعض الأغذية التى تحتوى على نسبة عالية من الدهن مثل : الزبد ، والمرجارين (حيث يؤدى تكون الأحماض الدهنية إلى ظهور الطعم والرائحة التزنخية) . ويعتبر تحلل الدهن إحدى المشاكل الرئيسية فى معاملات المجارى . وأغلب الطرق المستخدمة لمعاملة الكميات الضخمة من مياه المجارى تستخدم طرقاً عديدة لإزالة الدهن والشحم ؛ لأن وجودها سوف يزيد من الحاجة للأكسجين ، وبالتالى تؤدى إلى بطء العمليات الرئيسية فى تحلل المجارى .

أما الفوسفوليبيدات .. فإنها تمثل المكون الأساسى للأغشية الخلوية ، وهى عبارة عن إسترات للجلسرول مع حامضين دهنين وإستر فوسفاتى فى المجموعة الثالثة ، ومن أمثلتها الكولين Choline . ولأن الفوسفوليبيدات مكونات أساسية فى كل الخلايا .. فإن القدرة على تحليل فوسفوليبيدات الخلية العائلة ، يعتبر أحد العوامل الهامة فى انتشار الميكروب ذى الضراوة المرضية .

تـدريـــب (٣٨)

التحلل المائى لليبيدات **Lipids Hyrolysis**

يعتبر تحلل الفوسفوليبيدات ، مثل تلك الموجودة فى صفار البيض ، إحدى الوسائل التشخيصية المستخدمة فى علم الميكروبيولوجى ، للتعرف على بعض أفراد أجناس *Pseudomonas, Staphylococcus, Bacillus, Clostridium* وتشخيصها . ويؤدى كسر رابطة الفوسفات إلى تكون ليبيد غير ذائب فى الماء ، ويمكن الكشف عن هذا النشاط الإنزيمى بتكون طبقة معتمة فى البيئة حول كتلة الخلايا النامية .



شكل (١) : تفاعل صفار البيض - الذى يوضح تحلل الفوسفوليبيدات .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - أمامك طبق من بيئة آجار صفار البيض . بالقلم الشمع قسم الطبق إلى أربعة أقسام .

٢ - بإبرة التلقيح .. لقح بنقطة من كل مزرعة سائلة من *Pseudomonos aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* فى وسط كل قسم .

٣ - حضن على ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٤ - افحص لوجود راسب معتم وسجل النتائج .

أسئلة QUESTIONS

١ - كيف ترتبط القدرة على مهاجمة الفوسفوليبيدات بالقدرة المرضية ؟

٢ - ما هو الاختلاف بين الفوسفوليبيديز أ ، ب Phospholipidases A,B ، عن الفوسفوليبيديز جـ ، د Phospholipidases C, D ؟

٣ - يتم تحلل الدهون ميكروبياً أساساً بواسطة الميكروبات الهوائية . لماذا ؟

إنزيمات التنفس RESPIRATORY ENZYMES

تحصل الخلية على الطاقة من خلال عمليات الأكسدة ، التى تتم فى النظم البيولوجية أساساً بنزع الهيدروجين والإلكترونات . ويتم نزع الهيدروجين من مادة التفاعل (المادة التى تتأكسد) وينتقل

عن طريق عدد من إنزيمات التنفس إلى مستقبل نهائى للهيدروجين . وتمد عملية انتقال الهيدروجين والإلكترونات الخلية بالطاقة مثلما تمد مساقط المياه الطاقة اللازمة لإدارة طواحين المياه . ويتم انتقال الهيدروجين والحصول على الطاقة من خلال سلسلة من تفاعلات الأكسدة والاختزال .

وتحدث الأكسدة البيولوجية باستخدام الأكسجين ، أو مواد أخرى كمستقبل نهائى للهيدروجين – ويعرَّف التنفس Respiration بأنه الأكسدة البيولوجية التى تحدث باستخدام الأكسجين الجوى (تنفس هوائى Aerobic respiration) ، أو أكاسيد غير عضوية مثل : النترات ، والكبريتات (تنفس لاهوائى Anaerobic respiration) . أما التخمر fermentation .. فيعرف بأنه الأكسدة البيولوجية التى تحدث عندما يتم تكسير مانح للهيدروجين (مادة كربوهيدراتية عادة) وتُستخدم أحد نواتج هذا التحليل كمستقبل نهائى للهيدروجين .

وكون الميكروب يتنفس ، أو يقوم بالتخمر ، فإن ذلك يعتمد على توفر الأكسجين الجوى ، ووجود الإنزيمات الضرورية لاختزال الأكسجين . وتتطلب الميكروبات الهوائية الحتمية obligate aerobes توفر الأكسجين الجوى كمستقبل نهائى للهيدروجين وتنمو فى وجوده فقط . وأحد أسباب عدم تحمل الميكروبات اللاهوائية الحتمية obligate anaerobes للأكسجين ، هو افتقادها لبعض الإنزيمات الضرورية لاختزال الأكسجين الجوى . وتحدد العلاقة بين الميكروبات والأكسجين الجوى المنطقة التى يغزوها الميكروب المرضى من الجسم . ومثالاً على ذلك .. نجد أن الميكروبات اللاهوائية الحتمية تغزو الجروح العميقة ، أو المناطق التى ينخفض فيها الإمداد بالدم (والأكسجين) .

تدريب (٣٩)

نشاط إنزيم الكاتاليز Catalase Activity

يوجد إنزيم الكاتاليز فى أغلب البكتيريا ، وهو ينشط تحلل فوق أكسيد الهيدروجين مع إنتاج الأكسجين الحر .

$$2H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O_2\uparrow$$

وفى كثير من الأحوال .. يمكن رؤية تصاعد غاز الأكسجين بسهولة كفقاعات بيضاء ، إذا إضيفت نقط قليلة من محلول ٣٪ H_2O_2 لمستعمرة ميكروبية ، أو لمزرعة سائلة . وفى الحالات التى يُشك فى سلبية نتيجة الاختبار .. يمكن وضع جزء من المزرعة على شريحة ، ثم فحصها بالقوة الصغرى للميكرسكوب بعد إضافة قليل من فوق أكسيد الهيدروجين .

ويعطى أغلب المزارع الميكروبية النامية على البيئات العادية ، تفاعل إنزيم كاتاليز واضح لايمكن

الشك فيه . أما الميكروبات السالبة للكاتاليز .. فإنها تكون لاهوائية . ومن بين الميكروبات السالبة للكاتاليز الهامة الأجناس الآتيـة : *Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Clostridium,* *Mycoplasma* .

ويحتوى إنزيم الكاتاليز على مركب الهيم بورفيرين Hemeporphyrin الموضح فى شكل (١) . ومركب البورفيرين الحلقى لا يعتبر من مميزات الكاتاليز فقط ، ولكن أيضا من مميزات السيتوكرومات Cytochromes ، وهى حوامل الإلكترونات فى السلسلة التنفسية . الموجودة فى الكائنات الحية الهوائية ، وأيضا فى الكلوروفيل فى الخلايا الممثلة للضوء ، وفى الحالة الأخيرة يوجد Mg بدلاً من Fe فى الحلقة .

شكل (١) : مركب الهيم كمثال للبورفيرين المحتوى على حديد .

طريقة العمل (أ)

١ – لقح أنبوبة من آجار مستخلص الخميرة المائل ، وأخرى من مرق مستخلص الخميرة بمزرعة *Streptococcus faecalis* ، وأيضا لقح أنبوبة آجار مائل أخرى ، وأنبوبة مرق من مرزعة *Staphylococcus aureus* .

٢ – حضن عند ٣٧° م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة .

٣ – ضف بضع نقط من محلول H_2O_2 ٣٪ إلى كل من أنابيب الآجار المائل ، والمرق ، ولاحظ بدقة لظهور فقاعات أكسجين وتكونْ رغوه على السطح .

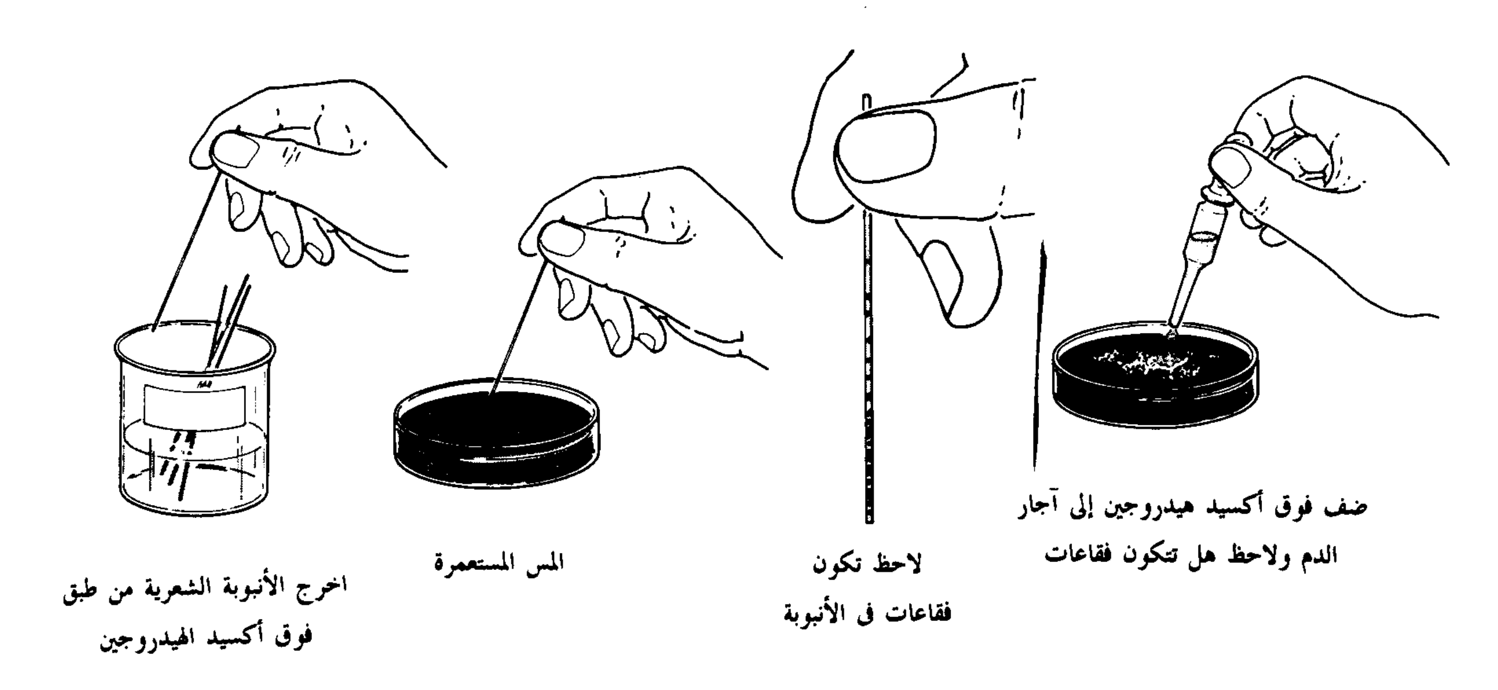
طريقة العمل (ب)

١ – خطط طبق من بيئة آجار الدم بمزرعة *Streptococcus faecalis* وآخر بمزرعة *Staphylococcus aureus* .

٢ – حضن عند ٣٧° م .

٣ – اغمس أنبوبة زجاجية شعرية فى الكأس الذى به محلول H_2O_2 ٣٪ الذى أمامك ، بحيث تمتلئ الأنبوبة الشعرية حتى ارتفاع ٢٠ مم ، ثم المس سطح إحدى مستعمرات *Streptococcus faecalis* بالأنبوبة الشعرية ، ولاحظ هل تتكون فقاعات فى الأنبوبة الشعرية . كرر نفس العمل مع لمس مستعمرة من *Staphylococcus aureus* ، وسوف يتكون فوران بسرعة فى حالة لمس مستعمرة لميكروب ينتج إنزيم الكاتاليز .

٤ – ضف نقطة من H_2O_2 ٣٪ لمنطقة من طبق آجار الدم خالية من المستعمرات ، ولاحظ هل يظهر أى نشاط لإنزيم الكاتاليز (انظر شكل ٢) .



شكل (٢) : طريقة الأنبوبة الشعرية لاختبار الكاتاليز .

تـدريـــب (٤٠)

اختبار الأكسيديز Oxidase Test

يتم فى اختبار الأكسيديز ، قياس قدرة الميكروب على أكسدة بعض الأمينات العطرية مثل : p-Aminodimethylaniline لتكون نواتج نهائية ملونة . وترتبط هذه الأكسدة مع النشاط العالى لإنزيم السيتوكروم أكسيديز فى بعض البكتيريا . ومن بينها أجناس *Pseudomonas, Neisseria* . لوجود نتيجة إيجابية لاختبار الأكسيديز أهمية كبيرة فى تعريف هذه الأجناس ، كما أن هذا الاختبار مفيد فى تمييز البكتيريا المعوية (عائلة Enterobacteriaceae) التى تتميز بأنها سالبة لاختبار الأكسيديز .

وسوف تستخدم فى هذا التدريب شريط مغمور فى دليل اختبار الأكسيديز ، ثم يتم وضع جزء من المزرعة البكتيرية عليه لإجراء الاختبار . وإذا كانت النتيجة إيجابية .. فإن سيتوكروم C المؤكسد الذى تكون نتيجة نشاط إنزيم السيتوكروم أكسيديز ، سوف يؤكسد p-aminodimethylaniline ليكون مركبًا أحمر اللون .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – أمامك مزارع آجار فى أطباق لكل من *Pseudomonas fluorescens ; Escherichia coli* . باستخدام إبرة تلقيح معقمة ، انقل جزءًا من النمو من مستعمرة نقية منعزلة من طبق الـ Pseudomonas ، ثم ادعكها جيدًا على المساحة رقم ١ من شريط الاختبار (انظر شكل ١) .

٢ – بعد حوالى ٣٠ ثانية .. لاحظ التغير فى اللون فى المنطقة من الشريط التى أضيفت إليها المزرعة ، حيث إن ظهور لون أزرق يعتبر دليلاً على أن النتيجة إيجابية .

٣ – كرر ما سبق على شريط آخر مع المزرعة الثانية وهى *E. coli* .

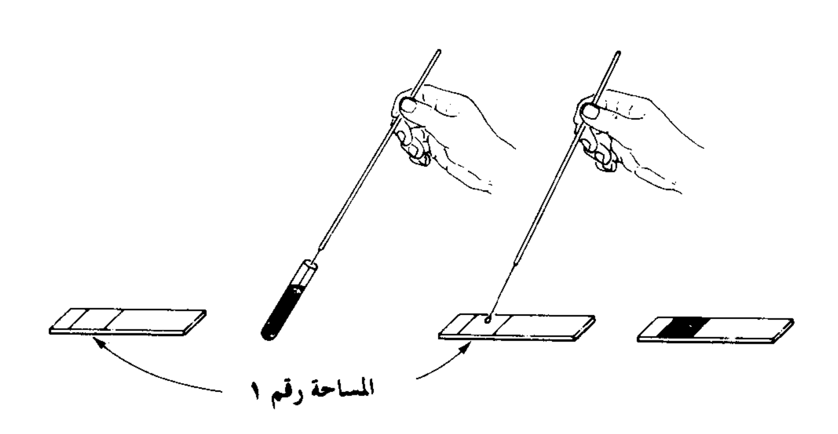
ومن الطرق التقليدية لتقدير نشاط الأكسيديز .. استخدام محلول حاضى من p-aminodimethylaniline ، ولكن هذا المحلول من الصعب تحضيره ، وغير ثابت فى المحلول المائى أيضًا ؛ مما يؤدى إلى ظهور نتائج مزيفة . أما إذا وضعت دلائل اختبار الأكسيديز على شريط ، وبقيت فى حالة جافة .. فإنها تبقى ثابتة ، وهذا أحد أمثلة مميزات استخدام شرائط الاختبار Impregnated test strips المغطاة بالدلائل فى الاختبارات الميكروبيولوجية . ويمكن الاستفادة من الشرائط المغمورة بالدلائل فى عديد من الدراسات التشخيصية ، والميكروبيولوجية . وتتميز هذه الطرق عن الطرق التقليدية بسرعتها وسهولتها ودقتها .

QUESTIONS
أســـئلة

١ – أى الميكروبات يحتوى على إنزيم سيتوكروم C أكسيديز ؟

٢ – ما هى الإنزيمات الأخرى التى تعطى اختبار أكسيديز إيجابيًّا ؟

٣ – ما هو المركب الملون الذى يتكون ؟



شكل (١) : استخدام شرائط الاختبار فى تقدير نشاط إنزيم الإكسيديز .

تــدريـــب (٤١)

Action of Bacteria on Milk
تأثير البكتيريا على اللبن

يعتبر اللبن الحليب الخض skim milk بيئة ممتازة لنمو البكتيريا نظرًا لاحتوائه على سكر اللاكتوز ، وبروتين (الكازين) ، علاوة على الفيتامينات ، والأملاح المعدنية ، والماء . وتعتمد النتجة النهائية لفعل البكتيريا فى اللبن ، أساسا على ماذا تهاجم البكتيريا ، هل تهاجم المادة الكربوهيدراتية ، أو البروتينية فى اللبن الخض . وتستطيع بعض البكتيريا تخمير اللاكتوز ، بينما البعض الآخر يحلل الكازين ، كما أن بعض البكتيريا تؤثر على كليهما . ولأن كل نوع من البكتيريا يؤثر على اللبن الخض بطريقة مختلفة .. فإن التفاعلات التى تحدث فى بيئة اللبن يستفاد منها فى تعريف الميكروبات .

إنتاج الحامض

يؤدى تخمر اللاكتوز فى اللبن إلى إنتاج أحماض مما يخفض الرقم الهيدروجينى . وإذا ما أضيف دليل للحموضة فى اللبن مثل دليل عباد الشمس ، فإننا نستطيع الاستدلال على تكون الحامض ، فمع تراكم الحامض يتحول لون عباد الشمس إلى اللون الأحمر .

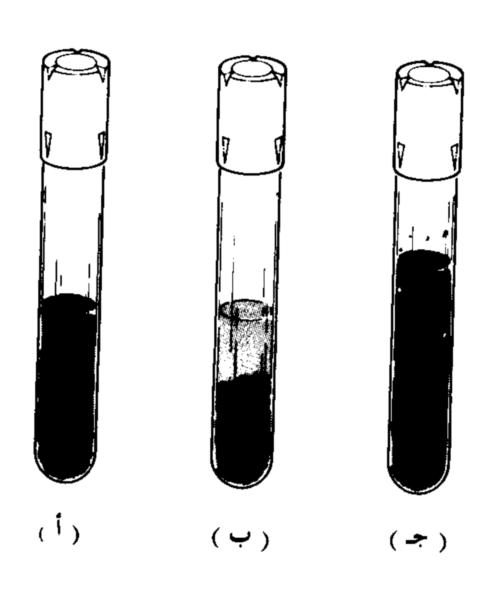
ومع زيادة حموضة اللبن وانخفاض الرقم الهيدروجينى إلى درجة أقل من نقطة تساوى الكهربية للكازين isoelectric point .. فإن ذلك يؤدى إلى تجبنه مكونًا خثرة حامضية (انظر شكل ١ – أ) . وإذا تكونت الحموضة بسرعة كافية ، فإن التجبن يصحبه انكماش مع انفراد الشرش من الخثرة ، ويظهر الشرش كسائل بللورى رائق لحد ما على سطح الخثرة الحامضية

الاختزال

تعتبر صبغة عباد الشمس ، علاوة على دورها كدليل للحموضة ، دليلاً على حالة التأكسد والاختزال . فإذا تمت إزالة الأكسجين من بيئة اللبن بعمل البكتيريا الاختزالية .. فإن عباد الشمس يختزل إلى لون أبيض Leuco state . ويظهر هذا الاختزال فى البيئة كطبقة بيضاء ، تبدأ فى الظهور من قاع الأنبوبة وتستمر إلى أعلى حتى تصل إلى السطح فى الخثرة الحامضية . وتستطيع بعض الميكروبات القيام بالاختزال التام لبيئة لبن عباد الشمس ، بحيث تظهر كلها بيضاء فيما عدا حلقة على سطح الخثرة . وتبقى هذه الحلقة حمراء نظرًا لأكسدتها بواسطة الأكسجين الجوى . وباختزال لون عباد الشمس .. يصبح غير قادر على العمل كدليل على تكون الحموضة .

الخثرة الإنزيمية وتحلل البروتين : Rennet curd and proteolysis

يحتوى كثير من الميكروبات على إنزيمات شبيهة بالرنين rennet-type enzymes ، وهذه تجبن الكازين دون تكون حموضة (انظر شكل ١ – ب) . وفى العادة .. فإن الميكروبات القادرة على إحداث التجبن الإنزيمى تكون قادرة أيضًا على تحلل البروتين ؛ أى أنها تحتوى على الإنزيمات الهاضمة للخثرة الإنزيمية . وعندما يحدث تحلل للبروتين .. فإن الخثرة تتحلل إلى نواتج ذائبة تظهر كسوائل صفراء ، أو بلون القش .



شكل (١) : تأثير البكتيريا على بيئة اللبن .
(أ) تجبن حامضى .
(ب) تجبن إنزيمى مع هضم البروتين .
(جـ) تكون غاز .

ورغم أن التحلل البروتينى يحدث عادة تحت الظروف المتعادلة ، إلا أن هناك حالات خاصة كما فى حالة بعض سلالات *Streptococcus faecalis* ، التى تحدث تحللاً بروتينيا للخثرة الحامضية .

تكون القلوية

يمكن ملاحظة تكون القلوية بتغير لون عباد الشمس من اللون البنفسجى إلى الأزرق . وتظهر القلوية نتيجة نزع مجاميع الكربوكسيل ، أو الأمين من الأحماض الأمينية فى الكازين (انظر تدريب ٣٧) .

تكون الغاز

تكون بعض الميكروبات غازا أثناء نموها فى بيئة اللبن . يسبب الغاز فقاعات ، أو ثقوب فى الخثرة التى عادة ما تكون خثرة حامضية (انظر شكل ١ – جـ) . ويُكوِّن بعض الميكروبات كثيرًا من الغاز مما يمزق الخثرة ، وتسمى هذه الحالة تخمراً عاصفاً للبن stormy fermentation ، وهى صفة مميّزة لبعض أنواع الكلوستريديا Clostridia ، وغيرها من الميكروبات القوية التخمر .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح كل من : *Escherichia coli, Streptococcus lactis, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris* فى أنابيب بيئة لبن عباد الشمس .

٢ – حضن عند ٣٧° م ولاحظ التغيرات التى تحدث خلال ٢ – ٧ أيام .

أسـئلة QUESTIONS

١ – عند اختزال لبن عباد الشمس – يبقى عباد الشمس ملونا عند السطح . لماذا ؟

٢ – عند أى رقم هيدروجينى تتكون الخثرة الحامضية ؟ وماهى العلاقة بين هذا الرقم الهيدروجينى ونقطة تساوى الكهربية للكازين ؟

٣ – ما هو القياس الذى يمكنك استخدامه لتمييز تكون الشرس عن تحلل البروتين ؟

الباب التاسع

عزل وتعريف المزارع البكتيرية

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL CULTURES

فى التدريبات السابقة ، درسنا تأثير التغيرات فى الوسط البيئى على المزارع الميكروبية النقية ، لكن يجب أن نضع فى اعتبارنا ، أن نمو وموت الميكروبات فى الطبيعة يتأثر بعديد من العوامل البيئية المتداخلة . وتسمى دراسة العلاقة بين الميكروبات والوسط البيئى باسم علم البيئة الميكروبية microbial ecology . ولدراسة تأثير عامل ما تحت الظروف المعملية .. فإننا نقوم بدراسته ، بالنسبة لمتغير وحيد . أما فى الطبيعة .. فإن كثيرًا من المؤثرات يعمل فى نفس الوقت ، وتحدد محصلة فعل هذه المؤثرات مصير الميكروبات . ومثال على ذلك : نجد أن حساسية ميكروب ما للحرارة تعتمد بدرجة كبيرة على الرقم الهيدروجينى ، علاوة على الضغط المائى للوسط . وبالمثل .. فإن التأثير القاتل للأشعة المؤينة على الميكروبات ، يعتمد على وجود ، أو غياب الأكسجين الجوى ، وعدة عوامل أخرى .

والهدف النهائى لدراسة علم البيئة الميكروبية ، هو فهم علاقة الميكروبات بكل مظاهر الوسط الذى تعيش فيه سواء الفيزيائية ، أو الكيميائية ، أو البيولوجية . ومن الناحية العملية .. فإن التحكم فى الميكروبات فى الطب ، والتخمرات ، والصناعات الغذائية سوف يعتمد على الفهم الجيد للعلاقة بين العوامل البيئية ، والميكروبات .

و نادرا ما تحتوى البيئة الميكروبية على نوع ميكروبى واحد . ولذلك .. فإنه من الضرورى لدراسة الميكروبات فى وسط ما أن يُعزل كل نوع فى مزرعة نقية ، ويتم تعريفه . وعملية عزل نوع بكتيرى معين من خليط الميكروبات يمكن تبسيطها بالاستفادة من بعض المميزات الخاصة للميكروب ، واحتياجاته الغذائية والحرارية ، ونواتج التمثيل ، ومميزات أخرى مشابهة .

وعلى هذا .. فإن الميكروب المحب للحرارة Thermophilic الهوائى ، يمكن عزله من الميكروبات الموجودة معه ، بتحضين عينة تربة فى طبقات رقيقة عند درجة حرارة ٦٠° م . أما إذا تم التحضين عند الظروف اللاهوائية فإننا نستطيع عزل البكتيريا المحبة للحرارة اللاهوائية . وبتنظيم الحرارة

والإمداد بالأكسجين .. فإننا نستطيع توفير ظروف انتقائية تحدد أنواع الميكروبات النامية ، والميكروبات التى لا تستطيع أن تتجاوب مع هذه الظروف لا تستطيع النمو .

ويمكن بإضافة مواد كيميائية معينة للبيئة الأساسية ، أو بتوفير ظروف معينة خاصة أثناء نمو المزرعة ، فإنه من الممكن :

١ – تثبيط نمو الميكروبات غير المرغوبة ، وفى نفس الوقت السماح بنمو الميكروب المطلوب وهذا يسمى الانتخاب بالتثبيط repression selection .

٢ – تشجيع نمو الميكروب المطلوب بحيث يتغلب فى نموه على الميكروبات المنافسة ، وهو ما يسمى الانتخاب بالإكثار enrichment selection .

وفى بعض الأحوال .. فإن عزل ميكروب من مزرعة مختلطة يمكن أن يتم ببساطة ، إذا ما أمكن أن نميز الميكروب المطلوب عن غيره أثناء النمو . وفى مثل هذه الطريقة .. فإنه ليس من الضرورى استخدام مثبط خاص للميكروبات غير المرغوبة ، أو مادة تساعد على إكثار الميكروب المطلوب ، وتسمى هذه الطريقة باسم الأطباق التفريقية differential plating .

وقد أمكن استحداث العديد من طرق العزل ، التى تعتمد على ارتباط أكثر من نوع من الأسس السابقة . ومن الواضح أنه كلما زادت معلوماتنا عن صفات الميكروب المطلوب ، زادت الفرصة أمامنا لاستحداث بيئة تساعد على التخلص من الميكروبات المنافسة .

استخدام المزارع الانتقائية ، ومزارع الإكثار فى العزل

USE OF SELECTIVE AND ENRICHMENT CULTURE

تأثر علماء الميكروبيولوجى كثيرا بالطريقة التى وضعها العالم الألمانى Beijerinck ، والتى قلد فيها الطبيعة ، حيث يتم فيها استخدام مجموعة من الظروف البيئية مع مجموعة مختلطة من الميكروبات ، مما يؤدى إلى تشجيع نمو ميكروب معين من خلال توفير ميزة له على الميكروبات المنافسة . ومثال على ذلك .. فإن ضبط الرقم الهيدروجينى فى البيئة إلى حوالى pH ٤,٠ ، فإن نمو أغلب البكتيريا يتوقف ، بينما ينشط نمو الميكروبات المقاومة للحموضة مثل الخمائر والفطريات . وكمثال آخر .. فإنه إذا تم إعداد بيئة تحتوى لكتات صوديوم فقط كمصدر للطاقة ، فإن المسرح سوف يكون مهيئا لنمو الميكروبات القادرة على استخدام اللكتات مثل أجناس *Propionibacterium, Veillonella* . وبالمثل .. فإن استبعاد مركبات النيتروجين من البيئة ، فإنه لن ينمو منها إلا الميكروبات المثبتة للنيتروجين فقط . وباستبعاد الأكسجين من الوسط فإن البكتيريا الهوائية سوف تتوقف . ، أما إذا ما استُبعد كل من مركبات الأكسجين ، والنيتروجين من البيئة (مع الإمداد بغاز النيتروجين) فإن الميكروبات اللاهوائية المثبتة للنيتروجين سوف تنمو فقط .

إن عدد التغيرات التى يمكن عملها لتوفير الظروف الانتقائية لعزل الميكروبات كبير جدًا ، بحيث يمكننا عزل أى ميكروب بتبديل ظروف الوسط ، طالما وجد الميكروب المطلوب عزله فى هذا الوسط ، وطالما حققنا الظروف البيولوجية المناسبة له . وعادة .. فإن أكثر من نوع ميكروبى واحد يستجيب للوسط الانتقائى الذى تم إعداده ؛ لهذا فمن النادر أن نحصل على مزرعة نقية فى المراحل الأولية لاستخدام البيئات الانتقائية ، وعلى ذلك .. فإنه للحصول على مزارع نقية بهذه الطريقة ، تلزم إعادة الزراعة باستخدام الأطباق المصبوبة ، أو المخطوطة من بيئة الإكثار السائلة على بيئة صلبة ، أو نصف صلبة . فى بعض الأحوال .. قد يلزم – قبل استخدام البيئات الصلبة – أن تمر المزرعة بعمليات نقل ، وزراعة عدة مرات على بيئة الإكثار السائلة ، وذلك لتقليل عدد الميكروبات التى تنافس الميكروب المطلوب عزله ، والتى قد تستطيع النمو لعدة أجيال على المواد الغذائية التى تنتقل إلى البيئة الانتقائية مع العينة التى يتم العزل منها . فمثلاً .. إذا استخدمنا عينة من كرش الحيوانات المجترة ، أو عينة من التربة كمصدر للحصول على ميكروب ما ، فإن إضافة العينة إلى البيئة الانتقائية سوف يغير تركيب البيئة لدرجة قد لا تصبح معها عندئذ بيئة انتقائية . ولكن بنقل المزرعة النامية إلى دورق آخر من البيئة الانتقائية .. فإن تلوثها بالمواد الغذائية التى أتت من العينة سوف يتم تخفيفه . ولأن الميكروب المطلوب عزله يشكل عادة جزءاً ضئيلا من المجموعة الميكروبية ، فإنه من الصعب منع تداخل الميكروبات الأخرى فى العزل إلا بتقليل حجم العينة .

ويجب أن تضع فى اعتبارك – اذا لم تكن تعرف فعلا – أنه لا توجد مجموعة من الظروف المحددة التى لايمكن اعتبارها ظروفاً انتقائية بطريقة ، أو بأخرى . وأى مزرعة تتم تنميتها قد تكون انتقائية لميكروبات محددة حتى بدون قصد ، وذلك من خلال : تركيب البيئة ، درجة حرارة التحضين الرقم الهيدروجينى ، درجة التهوية ، وغيرها من العوامل . وكقاعدة عامة .. فإن البيئات المستخدمة فى بيئات الانتقاء المحددة التركيب ، أو فى بيئات الاكثار ، تغطى الاحتياجات الغذائية الدنيا والظروف المزرعية المثلى لنوع ميكروبى معين . وعلى هذا .. فإنك تستطيع أن تحدد ، وتتحكم فى نوع النمو الناتج فى هذه البيئات بدرجة أكبر مما لو استخدمت بيئات من المواد العضوية المعقدة التى تساعد على نمو مجموعة كبيرة من ميكروبات متنوعة غير مطلوبة .

ومن الممكن تعديل الطريقة الانتقائية فى اتجاه جديد – وذلك بعزل ميكروب قادر على القيام بتفاعل معين . فلو فرضنا – مثلاً .. أنك ترغب فى عزل ميكروب يستطيع تحليل اليوريا ، فإن العينة – محتويات الكرش مثلا – يمكن زراعتها على بيئة تحتوى على يوريا ، ودليل للحموضة . ومن بين الميكروبات النامية سوف توجد ميكروبات تكون الأمونيا من اليوريا التى يمكن ملاحظة مستعمراتها بتغير لون الدليل . ويمكن بالتالى إجراء العزل من هذه المستعمرات ، والتأكد من نقاوة المزرعة المعزولة ، ثم اختبار الميكروب ثانية بالنسبة لتحليله لليوريا . وبالمثل .. فإذا أردت عزل نوع من الميكروبات القادرة على تخمير سكر السلليبيوز Cellibiose ، فإنك تضيف هذا السكر كمصدر وحيد للطاقة فى بيئة سائلة ، ثم بعد النمو عليها تقوم بزراعة الميكروبات النامية على أطباق بيئة آجار

السلليبوز ، مع وجود دليل للحموضة لتوضيح المستعمرات المخمرة للسلليبوز . ويجب عند إعداد أى بيئة الاهتمام بالتفاصيل الأخرى مثل : تركيز المادة المنظمة للحموضة ؛ ففى الأمثلة السابقة إذا أضيف تركيز عال من المادة المنظمة للحموضة ؛ فإن ذلك سوف يؤدى إلى عدم ظهور تكون الأمونيا ، أو تكون الحامض .

تعتبر بعض المصادر الطبيعية للميكروبات مثل التربة ، والوحل ، ومياه البرك ، مصادر جيدة لعزل الميكروبات التى لا تعرف لها مصادر محددة للحصول عليها . بينما هناك أنواع ميكروبية أخرى ، يلزم البحث عنها فى مصادر محددة مثل اللبن الخام الحامض sour raw milk عند البحث عن *Streptococcus lactis* ، أو الجبن السويسرى عند عزل *Propionibacterium* أو البيرة غير المعقمة ، أو الفواكه عند عزل *Acetobacter* ، أو البراز عند عزل *Streptococcus faecalis* ، أو الأوراق الخارجية للكرنب عند عزل *Leuconostoc* .

وفى العادة .. يستخدم جرام واحد ، أو اثنين من المادة فى العزل . وتوضع البيئات السائلة فى زجاجات صغيرة ، أو دوارق ، فى طبقات رقيقة فى حالة الحاجة للظروف الهوائية ، كما قد تملأ الدوارق تماما ، ويحكم غلقها للحصول على ظروف لاهوائية أو يستخدم جو من غازات خاصة ، التى تضاف مباشرة فى دوارق محكمة الغلق ، أو فى أوعية كبيرة توضع فيها الدوارق التى يحكم غلقها أثناء التحضين .

إذا ما احتجت إلى عمل بيئة انتقائية ، أو بيئة إكثار لأحد الأنواع الميكروبية التى سبق ذكرها ، قم بمناقشة احتمالات تنفيذ هذه الدراسة مع مشرف الدرس العملى .

تدريـــب (٤٢)

طريقة الأطباق التفريقية Differential Plating

فى هذا التدريب .. ستتم الاستفادة من المميزات الفسيولوجية للبكتيريا التى يمكن تمييز مستعمراتها بسهولة على الأطباق . وفى الجزء الأول .. سوف يتم البحث عن البكتيريا المخمرة للاكتوز فى اللبن . ويتم وضع دليل حساس للحموضة فى بيئة آجار اللاكتوز ، وبهذا يمكنك بالنظر تمييز المستعمرات التى تكوّن حامضًا من اللاكتوز .

فى الجزء الثانى .. سوف نبحث فى عزل الميكروبات المحللة للكازين من التربة ، حيث نستخدم نفس الفكرة السابق استخدامها فى تدريب (٣٥) لقياس القدرة على تحليل الكازين .

طريقة العمل — PROCEDURE

١ – بكتيريا تخمير اللاكتوز — Lactose-fermenting bacteria

(أ) قم بإسالة ٣ أنابيب من بيئة اللاكتوز ، ومستخلص الخميرة المحتوية على دليل بروم كريزول بربل ، ثم بردها إلى ٤٥°م .

(ب) اعمل أطباقا مصبوبة من عينة اللبن التى أمامك ، باستخدام طريقة التخفيف بالإبرة (١ ، ٢ ، ٣ غمسات إبرة – انظر تدريب ٧) .

(جـ) حضن الأطباق عند ٣٧°م حتى الدرس العملى التالى .

(د) افحص الأطباق للمستعمرات المحاطة بهالة صفراء ، حيث إن دليل بروم كريزول بربل يعطى لونا أصفر عند الرقم الهيدروجينى أقل من ٥,٢ ، وبهذا .. فإن اللون الأصفر يكون دليلاً على تكون الحموضة .

٢ – بكتيريا تحليل الكازين — Casein-hydrolyzing bacteria

(أ) قم بإسالة ٣ أنابيب من بيئة آجار اللبن الخض skim milk agar ، وبردها حتى ٤٥°م .

(ب) اعمل أطباقا مصبوبة باستخدام طريقة التخفيف بالإبرة ، وذلك من تخفيف التربة التى أمامك .

(جـ) حضن الأطباق عند ٣٠°م حتى الدرس العملى التالى .

(د) افحص الأطباق لوجود المستعمرات المحاطة بهالة رائقة ، حيث يتحول الكازين المعقم فى الأطباق إلى مادة ذائبة بالتحلل . وعلى هذا .. فإن ظهور هالة رائقة حول المستعمرات يعتبر دليلاً على هضم الكازين .

٣ – اعمل شرائح بصبغة جرام من ثلاث مستعمرات مخمرة للاكتوز ، وثلاث مستعمرات محللة للكازين . هل تشترك الميكروبات المعزولة من نفس المصدر فى صفات مورفولوجية مشتركة علاوة على الصفات الفسيولوجية .

أسـئلة — QUESTIONS

١ – كيف يمكنك عزل البكتيريا المسؤولة عن حدوث تزنخ فى عينة من الزبد ؟

٢ – يمكن ملاحظة البكتيريا التى تكون حامض خليك بسهولة عند تلقيحها بالتخطيط على بيئة تحتوى على $Ca\ Co_3$. ما هو الأساس فى عزل هذه الميكروبات ؟

تـدريــــب (٤٣)

طريقة الأطباق الانتقائية
Selective Plating

من عينة تحتوى على خليط من الميكروبات ، يمكنك انتقاء ميكروب معين من خلال إعداد بيئة الانتقاء الملائمة بالتثبيط ، واستخدامها فى أطباق العزل . وفى الجزء الأول من هذا التدريب .. يمكنك استخدام مضاد حيوى لعملية الانتقاء بالتثبيط للميكروبات ، وذلك من عينة عصير فاكهة متخمر . وفى الجزء الثانى من التدريب .. يمكنك عزل أنواع مختلفة من البكتيريا من عينة براز ، بالزراعة على كل من آجار الازيد azide agar ، وبيئة الأيوسين وأزرق المثيلين (EMB agar) .

طريقة العمل
PROCEDURE

آجار الأكتيديون
Actidione Agar

١ – قم بإسالة أنبوبتين من آجار الجلوكوز (تحتوى الأنبوبة ١٥ مل) .

٢ – برد إلى ٤٥° م ثم صب أنبوبة فى طبق لاستخدامه فى التخطيط .

٣ – ضف إلى الأنبوبة الأخرى – تحت ظروف التعقيم – ١ ملليجرام (أو ٠,١ مل فى محلول مجهز للاستخدام بالتركيز المناسب) من الأكتيديون – خطط جيدا ثم صب الأنبوبة فى طبق آخر . لاحظ أن الأكتيديون مادة سامة فلا تستخدم الماصة .

٤ – خطط الطبقين باستخدام العصير المتخمر الذى أمامك .

٥ – حضن عند ٣٠° م حتى الدرس العملى التالى . لاحظ كيف ينتشر نمو الفطر على الأطباق التى لا تحتوى على أكتيديون ، وتمنع عزل مستعمرات البكتيريا . تستخدم المضادات الحيوية كأداة مثبطة فى أطباق البيئات بدرجات مختلفة من النجاح . وتمثل الفطريات والخمائر مشكلة خاصة نظرًا لنموها الذى قد يغطى سطح الطبق بسرعة ، ويجعل عملية العزل صعبة . والأكتيديون عبارة عن : مضاد حيوى يفرزه *Streptomyces griseus* يفيد كثيرا فى تثبيط نمو كثير من أنواع الفطريات .

ملحوظة

يتم إعداد محلول أكتيديون كمحلول مجهز مخزن للاستعمال ، وذلك بإذابته بنسبة ١٠ ملليجرام لكل ملليلتر ماء مقطر ، ثم تعقيمه بالترشيح ، ويمكن عمل ذلك عند ١٢١° م لمدة ١٥ دقيقة دون فقد معنوى فى كفاءته . ويمكن استخدام هذا المضاد الحيوى بكفاءة مع غيره من المثبطات الانتقائية

مثل : البنسلين ، البوليمكسين ، وصبغة البرليانت جرين Brilliant green ، وليس له تأثير مثبط على البكتيريا بالتركيز المستخدم .

آجار الأزيد وبيئة آجار الأيوسين وأزرق المثيلين Azide and EMB Agar

١ - قم بإسالة ٣ أنابيب من بيئة آجار التربتون ، ومستخلص الخميرة المحتوية على ٠,٠٢٪ أزيد الصوديوم ، وثلاث أنابيب من آجار EMB ثم بردها حتى ٤٥°م .

٢ - باستخدام طريقة التخفيف بالإبرة ذات العقدة .. اجر العزل من عينة البراز على كلتا البيئتين مستعملا طريقة الأطباق المصبوبة .

٣ - حضن الأطباق عند ٣٧°م لمدة يومين . لاحظ الاختلافات الواضحة فى شكل المستعمرات التى تظهر على البيئتين .

٤ - باستخدام إبرة التلقيح ، انقل مستعمرتين من المستعمرات التى فى حجم رأس الدبوس النامية على أطباق بيئة الأزيد ، ومستعمرين مثاليتين من أطباق *EMB* (استخدم جدول ١) ، إلى أربع أنابيب من بيئة مرق التربتون ومستخلص الخميرة .

٥ - حضن الأنابيب الأربعة من بيئة التربتون ومستخلص الخميرة عند ٣٧°م . ثم اعمل شرائح بصبغة جرام ، وافحص الشكل المورفولوجى للمزارع الناتجة من البيئتين الأساسيتين .

ملحوظة

قد لا تستطيع الحصول على مزارع نقية دائما بعزل مستعمرة من بيئة انتقائية . فبعض الميكروبات قد يثبط نموها فى البيئة الانتقائية ، ثم ينمو بالتالى عند نقله إلى بيئة لا تحتوى على المواد المثبطة .

يعتبر أزيد الصوديوم مادة سامة للنظم البيولوجية التى تحتوى على حديد ، لذلك فان الميكروبات التى لا تحتوى على هذه النظم ، تعتبر مقاومة نسبيًّا لهذه المادة .

أما بيئة آجار الـ EMB .. فإنها تستخدم عادة للكشف عن تلوث مصادر المياه بالمجارى ، وهى تعتبر بيئة انتقائية وتفريقية فى نفس الوقت ؛ فهى انتقائية لأن بعض الميكروبات السالبة لصبغة جرام (مثل : *E.coli*) تعتبر أكثر مقاومة لمعقد الايوسين ، وأزرق المثيلين عن البكتيريا الموجبة لجرام . وهى بيئة تفريقية لوجود سكر اللاكتوز ، حيث تظهر المستعمرات المخمرة للاكتوز ملونة ، غالبا ما تكون ملونة مع وجود لمعان معدنى metallic sheen ، بينما تُكوِّن الميكروبات غير المخمرة للاكتوز مستعمرات غير ملونة . وهذه البيئة لها أهمية خاصة فى التفرقة ، والتمييز بين الميكروبات السالبة لجرام

غير المتجرثمة وهى : *Escherichia coli* ، *Enterobacter aerogenes* . فرغم أن كلا الميكروبين ينموان فى بيئة EMB كما يظهر من جدول (١) ، إلا أن مظهر المستعمرات فى حالة بكتيريا *E. coli* المعوية يمكن تمييزه بسهولة عن *E. aerogenes* ، وهو الميكروب المشابه للأول لحد كبير ، ولكنه يعيش فى التربة وعلى النباتات .

جدول (١) : التفرقة بين مستعمرات *Escherichia coli* ، *Enterobacter aerogenes* النامية على آجار EMB .

الصفــــة	*Escherichia coli*	*Enterobacter aerogenes*
الحجم	مستعمرات محددة جيدًا ، قطرها بين ٢ - ٣ ملليمتر .	مستعمرات محددة جيدًا ، ولكنها أكبر من السابقة فى العادة قطرها بين ٤ - ٦ مم ، أو أكثر .
التزاحم	المستعمرات المتجاورة تظهر ميلا قليلا للاتحاد مع بعضها .	المستعمرات المتجاورة تتداخل مع بعضها بسرعة .
الارتفاع	المستعمرات مرتفعة قليلا - ويظهر سطح المستعمرة مسطحا ، أو مقعرًا قليلا ، ونادرا ما يكون محدبا .	المستعمرات مرتفعة بشكل ملحوظ ، ومحدبة بوضوح ، وفى بعض الأحوال فإن وسط المستعمرة ينخفض كثيرًا .
مظهرها فى الضوء النافذ	المستعمرات غامقة - الوسط أسود ويصل حجمه إلى حوالى $\frac{٣}{٤}$ حجم المستعمرة ، ومن الصعب مشاهدة التركيب الداخلى فى الجزء الغامق .	المركز بنى غامق - وليست كلها غامقة بنفس درجة *E. coli* ، والجزء الغامق أصغر بالنسبة لحجم المستعمرة كلها - وقد يظهر التركيب الداخلى للمستعمرة مكرمشا فى المستعمرات الصغيرة .
مظهرها فى الضوء المنعكس	المستعمرات غامقة - تشبه الزر - ذات دوائر مركزية - لها لمعان معدنى مخضر .	اللون أفتح كثيرًا من *E. coli* ، ولا يشاهد اللمعان المعدنى إلا نادرا وفى المركز المنخفض فقط .

أســــئلة QUESTIONS

١ - هل يمكنك من مصادر أخرى خلاف عصير الفاكهة المتخمر ، الحصول على نتائج تشابه تلك التى أمكن الحصول عليها من الجزء الأول من التجربة ؟ وأيضا بدلا من البراز فى التجربة الثانية ؟

٢ - لا يمكن استخدام البيئات المحتوية على ازيد ، أو سيانيد فى اجراء اختبار الكاتاليز . لماذا ؟

تعريف المجاميع الهامة من البكتيريا

IDENTIFICATION OF IMPORTANT GROUPS OF BECTERIA

أجريت محاولات فى علم التقسيم Taxonomy ، لترتيب الميكروبات فى مجموعات ، وتحت مجموعات بينها علاقات تشابه مع بعضها ، وترتيبها أيضا بالنسبة لأنواع الأحياء الأخرى .

وليس للميكروبات تراكيب تشريحية محددة ، أو علاقات تطويرية واضحة ، مثل التى يشاهدها علماء النبات ، أو الحيوان ، ويستخدمونها فى دراساتهم التقسيمية . لهذا فان نظم تقسيم البكتيريا تتم على أساس عدد من الصفات ، لا يدخل فيها الشكل المورفولوجى فقط ، ولكن أيضا الصفات المزرعية ، والفسيولوجية ، والإمراضية والسيرولوجية . وكما أن عالم البيولوجى يستفيد من الصفات التشريحية فى الدراسات التقسيمية للنبات ، والحيوان ، فإن عالم الميكروبيولوجى يستفيد من شكل الخلايا ، وترتيبها بالنسبة لبعضها وتركيب الخلية . كما أن شكل المزرعة على البيئات المعملية وشكل المستعمرات ، وتكوين الصبغات له قيمة كبيرة كأدوات فى عملية التقسيم . وعلاوة على هذه القائمة من الصفات المستخدمة فى تعريف البكتيريا ، فإنه يضاف إليها قدرة الميكروب على الاستفادة ، أو مهاجمة بعض المواد (مواد التفاعل substrates) ، وقدرتها على إحداث تغيرات ، وإنتاج مواد كيميائية يمكن الكشف عنها والتعرف عليها . كما أن قدرة بعض الأنواع على إحداث مرض تعتبر صفة مهمة فى تمييز البكتيريا . وهناك أداة مساعدة ولكنها قوية ، تستعمل فى تعريف الميكروبات التابعة لمجموعات معينة مثل : *Salmonella* ، *Streptococcus* وهى الاختبار السيرولوجى وسوف تناقش نظريته ، وطريقة إجرائه فيما بعد .

وعلى المستوى الواسع .. فإن الميكروبات غير الممثلة للضوء يمكن تقسيمها إلى مجموعتين ، وهى : البكتيريا الأوتوتروفية (ذاتية التغذية) ، والبكتيريا الهتيروتروفية (غير ذاتية التغذية) . وتستخدم البكتيريا الأوتوتروفية ، ثانى أكسيد الكربون والأملاح المعدنية كمصادر للكربون والنيتروجين ، وتؤكسد المواد غير العضوية للحصول على الطاقة ، ولاتعتمد على المواد العضوية لحياتها . وهذه الميكروبات ليست لها أهمية فى الفساد ، أو فى الأمراض ، ولكنها تلعب أدوارًا كبيرة فى دورة بعض العناصر فى الطبيعة . وعمومًا .. فإن البكتيريا الأوتوتروفية تنمو ابطأ من البكتيريا الهتيروتروفية . وتعريفها فى المعمل أكثر صعوبة .

أما الميكروبات الهتيروتروفية .. فإنها تحصل على الكربون والطاقة من المواد العضوية ، وكثير منها يحصل على النيتروجين من مصادر عضوية أيضا . وهذه المجموعة تضم أغلب البكتيريا ذات الأهمية الكبرى فى الطب والميكروبات ذات الأهمية التجارية . تعيش الميكروبات الهيتروتروفية فى مدى واسع من الأوساط كما أنها ذات نشاط متسع .

ورغم الاختلاف الواسع فى الخلايا الحية وفى استعدادها لحدوث الطفرات ، فإنه من المهم أن نتفهم الحقيقة التى تقول : « إنه تحت الظروف الطبيعية يوجد توازن بين الخلية ، والوسط الذى تعيش فيه ، ويساعد هذا التوازن على استمرار النوع فى هذا الوسط » .

ويعتبر جوهر هذه الحقيقة أساس نظام التقسيم ، الذى يؤكد أنه بالرغم من الاختلاف بين الأنواع ، فإن أنواعا معينة من الميكروبات توجد دائما فى مصادر محددة ، وأن مظاهر عملها فى هذه المصادر ثابتة لدرجة أنها تعتبر كافية لتعريفها . وفى الحقيقة .. فإنه قد لوحظ فى مرات عديدة ، أن السلالات المعملية القديمة قد تفقد بعض صفاتها المميزة لها . فعلى سبيل المثال .. نجد أن البكتيريا السبحية Streptococci تفقد قدرتها على تخمير سكريات معينة ، بعد تنميتها لمدة طويلة على البيئات المعملية الاصطناعية . وبالمثل .. نجد أن بكتيريا التيفود يمكن أن تصبح غير ممرضة ، أو أن بكتيريا السيدوموناس Pseudomonas يمكن أن تفقد القدرة على تكوين الصبغة الخضراء . هذه التغيرات تجعل الميكروب لا يمثل النوع المثالى المعروف طبقا للوصف الثابت له . ويجب أن يلاحظ أننا نستطيع أن نعزل أيضا من الأوساط الطبيعية ميكروبات مختلفة من النوع المثالى ، ولكن الطالب ذا الخبرة فى علم التقسيم يتوقع وجود هذه الاختلافات ويضع حدودا لها . وهذه الخبرة نتعلم منها الحقيقة التى تقول بأننا فى علم الميكروبيولوجى نتعامل مع خط متصل من الكائنات الحية ، التى تتداخل مع بعضها البعض ولايمكن فصلها فصلا حادا ، كما هو حادث فى الكائنات الأكبر .
يُلاحظ أن الاختبار الذى قد يعتبر هاما لتمييز جنس ، أو نوع معين ، قد يكون بلا قيمة فى حالة أخرى . فمثلا .. قدرة *Escherichia coli* فى تخمير اللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز ذات أهمية كبيرة فى تمييزها عن بعض البكتيريا العصوية القصيرة السالبة لجرام ، بينما مع المجموعات الميكروبية الأخرى .. فإن هذا الاختبار له أهمية قليلة ، أو ليست له أهمية فى عمليات التعريف . وبالمثل .. فإنه يمكن من البكتيريا الكروية تمييز جنس *Streptococcus* عن جنس *Staphylococcus* ، من خلال قدرة الجنس الأخير على إنتاج الكاتاليز بينما لاينتجه الأول . أما فى التمييز بين *Enterobacter - Escherichia* .. فإن هذا الاختبار عديم القيمة حيث إن كلا الجنسين ينتج الكاتاليز .

وفى هذا المجال .. فإنه من المناسب أن نذكر المرجع المستخدم فى تقسيم البكتيريا Bergey's Manual of Determinative Bacteriology . وهو مرجع إنسيكلوبيدى يوضح نظام التقسيم الذى يتبعه أغلب علماء البكتريولوجيا الأمريكيين . وهذا المرجع علاوة على وضعه كل نوع من البكتيريا فى التقسيم الأعلى وهو الجنس ، العائلة ، والرتبة كلما أمكن ، فإنه يتضمن وصفا تفصيليّا للصفات المزرعية لمئات من أنواع البكتيريا .

ومن المصاعب التى اعترضت علماء التقسيم ، أن كثيرا من نظم وصف الميكروبات التى أجريت بطريقة جيدة فى الماضى ، أصبح من المستحيل أن يُستفاد منها فى نظم التقسيم الحديثة ، لأن الطرق المزرعية قد تغيرت كثيرًا . وكثير من الصفات التى تستخدم حاليا لتحديد النوع ، أو الجنس لم تكن تستخدم عندئذ . وبالمثل .. فإن كثيرا من الصفات التى استخدمت فى الماضى لم تعد تستخدم

حاليا . ولكن بصرف النظر عن حكمنا على قيمة هذه الدراسات الرائدة ، فإن ما وصلت إليه لايجب أن يستبعد كلية ، ولابد أن يستخدم كلما أمكن على الأقل لتحديد من له فضل السبق فى تعريف ووصف نوع معين .

وفى كثير من الحالات .. فإن المعلومات المتاحة لعالم التقسيم ، عن مجموعة لم يتم الاهتمام بها من الميكروبات ، قد تكون غير كافية لوضع نظام للتقسيم ؛ لهذا فإن تقسيمها يجب أن ينتظر لدراسات مقبلة .

تـدريـــب (٤٤)

تعريف مزارع بكتيرية مجهولة

Identification of Unknown Bacterial Cultures

يعتبر عزل وتنقية وتعريف المزارع البكتيرية من أهم العمليات الرئيسية فى علم الميكروبيولوجيا . وتعتمد كل طرق التعريف على نقاء المزرعة أولاً . ولهذا فإننا لا نبالغ إذا أكدنا على الأهمية الكبرى بضرورة التأكد من نقاء المزرعة ، والمحافظة على استمرار نقائها طوال التعريف .

فى هذا التدريب .. سوف تعطى مزرعة لتعريف الجنس الخاص بها – باستخدام مرجع Bergey's Manual of Determinative Bacteriology الذى سوف يكون موجودا فى المعمل . وبالاستفادة بالمادة العملية فى الدرس العملى ، قم بإعداد نظام فصل separation achem مبدئى ، ثم إعداد بطاقة لنظام التعريف ، توضح أهم الاختبارات التى سوف تستخدم لتعريف الجنس – ويجب أن تعد هذه البطاقة قبل البدء فى التدريب لكى يمكنك الاستفادة من وقتك ، وبأقصى استفادة من البيئات المطلوبة فى عملية التعريف . ويوضح شكل (١) مثالاً لنظام الفصل .

طريقة العمل — PROCEDURE

١ – اعمل شريحة بصبغة جرام ، ثم ادرس حركة المزرعة ، وإذا لم تعطك هذه الدراسة نتائج واضحة للمزرعة ، اعد الدراسة بحيث يمكنك إعادة الاختبارين على مزارع حديثة (عمر ٢٤ ساعة أو قل) .

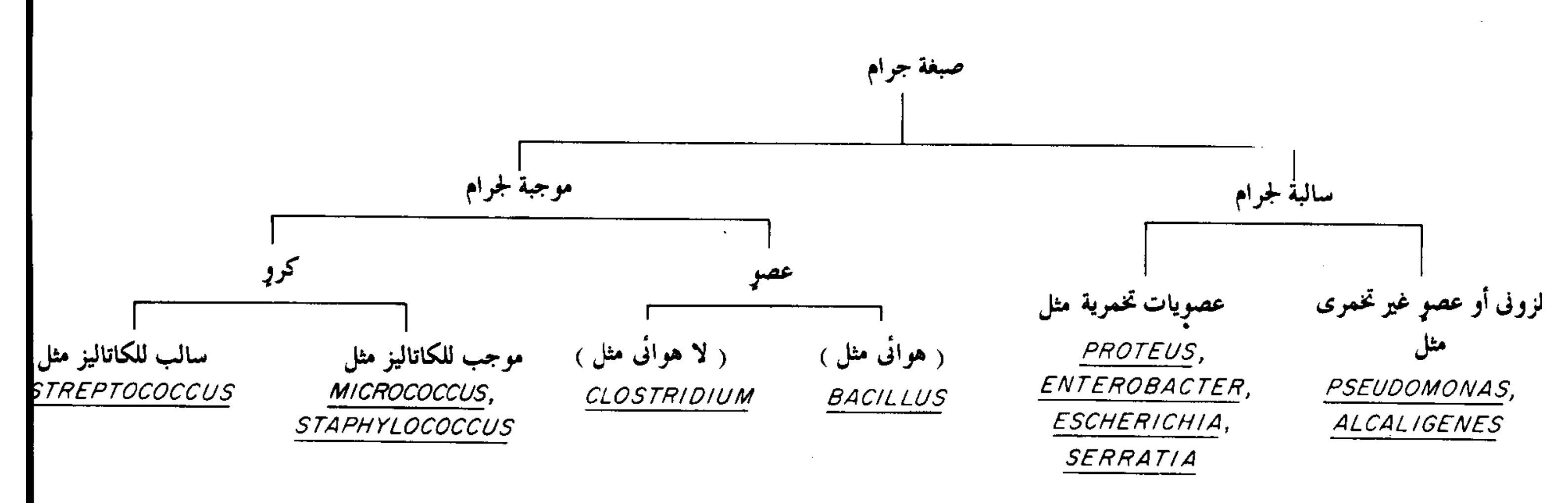
٢ – لقح أنبوبتين من بيئة مناسبة لكل مزرعة من المزرعتين المجهولتين ، ثم حضنهما على ٣٠° م ، استفِد من جدول (١) .. بمعاونة المعيد قم باختيار البيئة المناسبة لكل مزرعة مجهولة . سوف تستخدم إحدى هاتين المزرعتين الحديثتين ، والتى سوف تطلق عليها اسم مزرعة الدراسة ، كلقاح للدراسات التالية فى الدرس القادم . أما المزرعة الأخرى ..

فسوف تُحفظ كاحتياطى يمكن منه إعداد مزارع جديدة عند الحاجة . ويجب ألا تستخدم المزرعة الاحتياطية لتلقيح البيئات المختلفة ولكنها تخزن كاحتياطى لحين الحاجة لمزرعة جديدة ، حيث تخزن بعد نموها مباشرة فى الثلاجة وليس فى المحضن . ويجب أن تجدد هذه المزرعة على فترات مناسبة بقدر الإمكان ولتكن مرة كل اسبوع .

٣ – اعمل مزرعة مهتزة لدراسة حاجة البكتيريا للأكسجين .

٤ – من نتائج صبغة جرام ، الشكل المورفولوجى ، الحركة ، والعلاقة بالأكسجين .. فإن الوضع التقسيمى يكون قد ضاق لحد كبير – وبعد دراسة هذه النتائج ، يمكنك تحديد ما هى البيئات الإضافية والاختبارات الأخرى المطلوبة للتعريف . ويجب أن تضع خطة التلقيحات المطلوبة مقدما لمدة معقولة حتى يمكنك تحضينها للفترات المناسبة لكل اختبار . مثالاً على ذلك .. نجد أن اختبار تحليل بروتين اللبن يحتاج لعدة أيام تحضين قبل ظهور النتائج ؛ وعلى هذا فإنك لن تستطيع الحصول على النتائج الملائمة إذا قمت بتلقيح لبن عباد الشمس بالمزرعة المجهولة قبل ٢٤ ساعة من حاجتك لتقديم نتائجك .

٥ – قم بالاختبارات الفسيولوجية المطلوبة لتعريف الجنس لكل مجهول .



شكل (١) : نظام الفصل لتعريف مزرعة بكتيريه .

جدول (١) : الاختبارات المستخدمة لتعريف مختلف مجموعات البكتيريا

الاختبارات	كروى			عصو قصير						عصو طويل	
	Staphylo-coccus	*Strepto-coccus*	*Micrococcus*	*E. coli*	*E. aero-genes*	*Proteus*	*Alcali-genes*[5]	*Serratia*	*Pseudo-monas*	*Bacillus*	*Clostrid-ium*[6]
درجة حرارة التحضين	37°C	37°C	30°C	37°C	37°C	30°C	20°C	30°C	30°C	30°C	37°C
صبغة جرام والشكل (تدريب ١)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
الحركة (تدريب ٢)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
تخمر الكربوهيدرات (تدريب ٣)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
إسالة الجلاتين (تدريب ٣٦)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
التفاعل مع لبن عباد الشمس (تدريب ٤١)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
اختبارات الكاتاليز (تدريب ٣٩)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
الحاجة للأكسجين (تدريب ٢٥)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
النمو فى المرق المغذى	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
شكل المستعمرة	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
النمو على بيئة مرق مستخلص الخميرة (١)	X	X	X								
اختبار الإندول (تدريب ٣٧)				X	X						
اختبار MR - VP (٢)				X	X						
اختبار استخدام السترات (٢)				X	X						
اختبار اليورياز (٢)						X					
اختبار النمو على اجار المانيتول المائل (٣)								X			
اختبار الأكسيديز (تدريب ٤٠)									X		
اختبار صبغ الجراثيم (٤)										X	X
تحليل النشادر (تدريب ٣٤)										X	
تحليل الكازين (تدريب ٣٥)										X	
النمو على مرق الثيوجليكولات (تدريب ٢٦)											X

(١) رغم أن كثيراً من البكتيريا ينمو جيدًا على بيئات مستخلص اللحم (مثل المرق والآجار المغذى) ، إلا أن بعض الميكروبات مثل : Staphylococci, Streptococcei تتطلب بيئة أكثر غنى للنمو الجيد مثل : بيئة منقوع اللحم ، وبيئة مرق مستخلص الخميرة .

(٢) انظر ملحق تدريب ٤٤

(٣) لدراسة تكوين الصبغات

(٤) إذا كانت الجراثيم الداخلية غير واضحة فى تحضيرك ، لقح أنابيب آجار المنجنيز المائل بالميكروب ، ثم اجر صبغ الجراثيم للنمو الناتج . وعلى العموم .. فإن الجراثيم تتكون على سطح الآجار عن بيئة المرق، ويشجع تكوينها وجود كمية قليلة مثل ٢ جزء فى المليون منجنيز فى البيئة .

(٥) يتميز ميكروب *A. viscolactis* بقدرته على إحداث لزوجة شديدة فى اللبن ropiness (لبن مخاطى) . اغمس إبرة التلقيح فى سطح مزرعة لبن عباد الشمس ، ولاحظ القوام المخاطى الذى يلتصق بالإبرة عند سحبها .

(٦) اغل كل البيئات السائلة لمدة ١٠ دقائق واتركها لتبرد قبل التلقيح بالـ *Clostridium* .

ملحق تدريب (٤٤)

يحتوى هذا الملحق على توجيهات لعمل بعض الاختبارات ، وعلى معلومات إضافية تساعدك فى تعريف مزارعك .

استخدام الميكروبات للسترات Citrate Utilization

يمكن استخدام قدرة الميكروبات على الاستفادة من السترات كمصدر وحيد للكربون ، والطاقة ، لتمييز بعض العصويات السالبة لجرام . وتحتوى بيئة سيمون لآجار السترات Simmon's citrate agar على السترات كمصدر وحيد للكربون ، والطاقة . ويتخذ نمو الميكروب على هذه البيئة كدليل إيجابى لقدرته على استخدام السترات . ويلاحظ أن بعض الميكروبات التى تعطى نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار ترفع الرقم الهيدروجينى ، مغيرة لون دليل بروم كريزول بربل فى البيئة من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح أنبوبة آجار من بيئة سيمون لآجار السترات بمزرعتك المجهولة .

٢ – حضن عند ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٣ – يتخذ حدوث نمو للميكروب فى نهاية فترة التحضين ، دليلاً على أن نتيجة الاختبار إيجابية .

اختبار الحركة Motility Test

استخدم تحضيرا رطبا ، أو طريقة النقطة المعلقة التى ذُكرت فى تدريب ٢ .

اختبار أحمر الميثيل – فوجس وبروسكاور (MR - VP test)

هذه الاختبارات هامة فى تعريف العصويات السالبة لجرام غير المتجرثمة ، وبعض أنواع جنس Bacillus ، وذلك على أساس أن بعض البكتيريا بدلا من أن يعمل على تراكم نواتج حامضية من تخمر الجلوكوز ، يقوم بتحويل ناتج التمثيل الوسيط ، وهو حامض البيروفيك إلى مركبات متعادلة ، CO_2 . وفى اختبار فوجس وبروسكاور Voges - Proskauer . يتكون الأسيتيل ميثيل كربينول ($CH_3COCHOHCH_3$) كناتج متعادل يمكن الكشف عنه بسهولة .

أما اختبار أحمر الميثيل .. فإنه يكشف عن الميكروبات التى لا تحول النواتج الحامضية إلى مركبات

متعادلة ، وعلى هذا فإنها تعطى رقمًا هيدروجينيًا أقل من الميكروبات التى تكون مركبات متعادلة . ونظرًا لانخفاض الرقم الهيدروجينى .. فإن لون أحمر الميثيل يتحول إلى اللون الأحمر فى حالة النتيجة الإيجابية .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح أنبوبة من بيئة MR - VP بمزرعتك المجهوله .

٢ – حضن لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٧° م .

٣ – اختبر لوجود أستيل ميثيل كربينول كالآتى :-

(أ) خذ حوالى ربع المزرعة فى أنبوبة اختبار نظيفة .

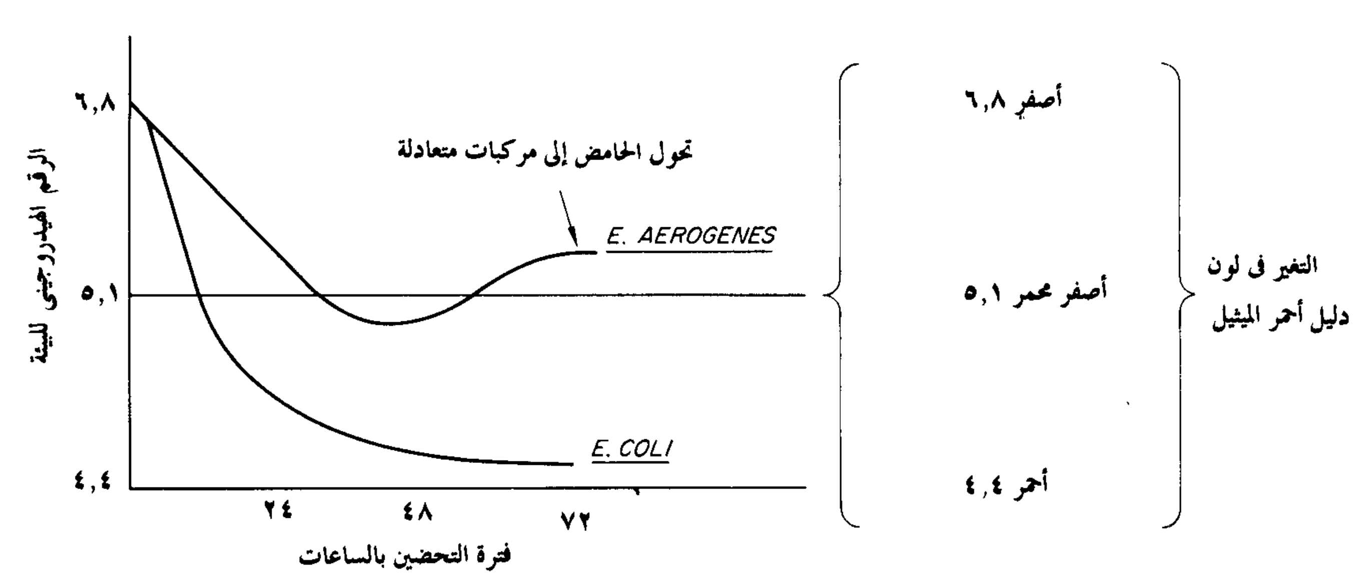
(ب) ضف إليها ٥, مل (حوالى ٨ – ١٠ نقاط) من محلول الفانافثول (محلول ٥٪ مذاب فى كحول) .

(جـ) ضف ٥, مل (حوالى ٨ – ١٠ نقاط) من محلول ٤٠٪ KOH الذى يحتوى على ٣,٪ كرياتين .

(د) رج بشدة ثم اترك الخليط لمدة ٥ – ٣٠ دقيقة .

(هـ) يعتبر ظهور لون أحمر قرمزى دليلا على وجود الأستيل ميثيل كربينول .

٤ – اختبر للحموضة بإضافة بضع نقاط من محلول كحولى لدليل أحمر الميثيل ، وبتكون لون أحمر يكون الاختبار إيجابيا ، أما إذا تكون لون أصفر فمعناه أن الاختبار سلبى .



شكل (٢) : العلاقة بين الحموضة وتكون أستيل ميثيل كربينول فى كل من *Enterobacter aerogenes* ، *E. coli* وعلاقة ذلك مع الوقت .

لاحظ أن أنابيب العينة تحتوى فقط على ٥ مل ، لأن هذا الحجم يعطى نسبة مرتفعة من الهواء فى الأنبوبة مع جزء صغير من البيئة ، وهذه الظروف تساعد على تكون الأستيل ميثيل كربينول .

تحلل اليوريا (اختبار اليورياز)

يمكن تمييز جنس *Proteus* عن بعض العصويات السالبة لجرام الأخرى بقدرته على تكوين كمية كبيرة من إنزيم اليورياز . وتحلل اليوريا بواسطة إنزيم اليورياز يؤدى إلى خروج الأمونيا كالآتى :

$$C(=O)(NH_2)_2 \xrightarrow[H_2O]{\text{urease}} 2\,NH_3 + CO_2 \uparrow$$

ولأن إنتاج NH_3 يرفع الرقم الهيدروجينى للبيئة .. فإنه يمكن التأكد من وجود نشاط إنزيم اليورياز بتحول لون دليل أحمر الفينول إلى اللون البنفسجى .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح أنبوبة من بيئة مرق اليوريا بمزرعتك المجهولة .

٢ – حضنها مع أنبوبة مقارنة على درجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة ..

٣ – يعتبر تكون لون بنفسجى دليلاً على أن الاختبار إيجابى (انظر جدولى ٢ ، ٣ التاليين) .

جدول (٢) : العلاقات التى تميز بين جنسين هامين من الميكروبات السالبة لجرام .

الجنس	الإندول	أحمر الميثيل	فوجس ــ بروسكاور	السترات
E. coli	+	+	–	–
E. aerogenes	–	–	+	+

جدول (٣) : ملخص لبعض البيئات ، والطرق التى تساعد فى تعريف البكتيريا المعوية .

البيئة	طريقة التلقيح	المحلول أو الدليل	النتيجة الإيجابية	دليل على وجود
SIM	وخز	كوفاكس	أحمر	الكبريتيد ـ الإندول ـ الحركة
MIO	وخز	كلوروفورم ـ كوفاكس	أحمر	الحركة ـ الإندول ـ إنزيم أرنيثين ديكر بوكسيليز
MR - VP	غمسة إبرة	أحمر الميثيل - الفانفثول كرياتين ـ KOH	أحمر	أستيل ميثيل كربينول ـ النواتج الحامضة
أنابيب بيئة سيمون المائلة	تخطيط	بروم ثيمول بلو	أزرق	استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون
أنابيب بيئة TSI المائلة	تخطيط ـ وخز	أحمر الفينول	أسوداد ـ فقاقيع ـ أصفر	تكون H_2S ، غاز ، تخمر اللاكتوز والدكستروز والسكروز
مرق اليوريا	غمسة إبرة	أحمر الفينول	أحمر	اليورياز
مرق الليسين	غمسة إبرة	بروم كريزول بربل	بنفسجى	نزع مجاميع الكربوكسيل من الليسين
أنابيب الفينيل الانين المائلة	تخطيط	كلوريد الحديديك	أخضر	نزع مجاميع الأمين من الفينيل الانين
السكريات	غمسة إبرة	بروم كريزول بربل	أصفر	التخمر

تـدريـــب (٤٥)

الطرق المتعددة الاختبارات الدقيقة الحجم لتعريف البكتيريا المعوية

Miniaturized Multitest Methods for the Identification of Enterics

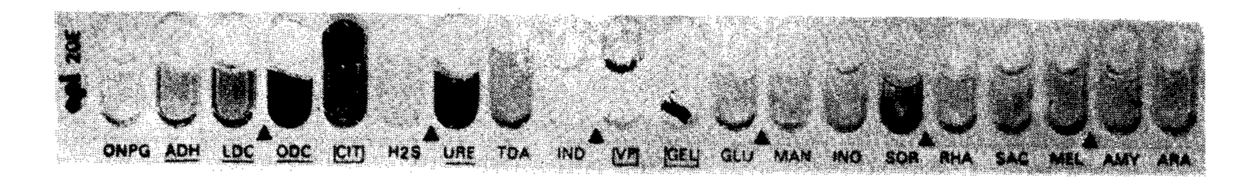
تتكون عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* من مجموعة كبيرة من العصويات الصغيرة السالبة لجرام التى بينها تقارب كبير فى الصفات . وترتبط تسمية العائلة باسم البكتيريا المعوية على أساس أن الوسط الطبيعى لمعيشة أغلبها هو أمعاء الإنسان ، والحيوان . وكثير منها ميكروبات مرضية هامة تسبب العديد من الأمراض المعوية ، علاوة على مشاكل مرضية للناقهين . ولهذا فإن التعريف السريع والدقيق لهذه الميكروبات المرضية ضرورى للعلاج السليم للأمراض التى تسببها .

والطريقة التقليدية لتعريف البكتيريا المعوية تتم باستخدام سلسلة من اختبارات تخمر السكريات ، واختبارات بيوكيميائية تتم فى أنابيب بيئات كما تم توضيحه فى تدريب ٤٤ . ولما كانت هذه الاختبارات مكلفة وتستهلك وقتا طويلاً ، فقد تم استبدالها بنظام تعريف يعتمد على اختبارات دقيقة الحجم متعددة . وتستخدم فى هذا النظام المعقد الدقيق الحجم ، مجموعة kit متعددة الأقسام ، متعددة الاختبارات ، والذى يتطلب كميات قليلة من البيئات ، ويعطى نتائج سريعة ، ويمكن استخدامه مع الحاسب الآلى . وفى هذا التدريب ستكون أمامك الفرصة لتستخدم اثنين من عديد

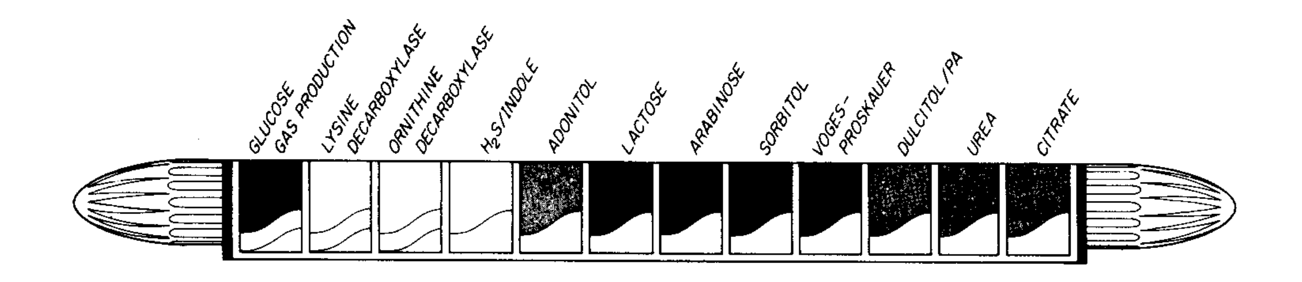
من المجموعات التجارية المتوفرة المستخدمة فى تعريف اثنين من مزارع البكتيريا المعوية المجهولة . وهذان النظامان هما API 20E ، Enterotube II(*) .

ويتضمن نظام API 20E عشرين قسما بلاستيكيًّا فى شريط تحتوى على بيئات جافة مختلفة (انظر شكل ١) ، ويتم إضافة الماء المعقم لكل قسم لإعداد البيئة ، وتلقح بمعلق البكتيريا المطلوب اختبارها ، ثم يحضن الشريط كله بوضعه فى صينية خاصة تمنع جفافه أثناء التحضين .

أما نظام Enterotube II .. فهو عبارة عن أنبوبة بلاستيكية مقسمة إلى : ١٢ قسما ؛ يحتوى كل قسم على بيئة مختلفة (انظر شكل ٢) ، ويستخدم سلك تلقيح خاص يمر خلال البيئات المختلفة ، ويبرز طرفه من طرفى الأنبوبة البلاستيكية . ولتلقيح البيئات .. فإن طرف هذا السلك يتم لمسه فى وسط مستعمرة الميكروب المطلوب تعريفه ، ثم يتم سحب السلك من الطرف الآخر ؛ فيمر الجزء الملقح على جميع البيئات ويلقحها ، ثم يعاد إدخال السلك ثانية داخل أربعة أقسام من الأنبوبة ، وذلك للمحافظة على الظروف المختزلة ، أو اللاهوائية فى الداخل .



شكل (١) : شريط طريقة API 20E .



شكل (٢) : طريقة Enterotube II .

(*) يمكن الحصول على معلومات أكثر خاصة بـ API 20E من Analytab products, 200. Express st., Plainview, Ny 11803 ، ويمكن الحصول على معلومات أكثر خاصة بـ Enterotube II . من Roche Diagnostics, Division of Hoffman-La Roche. Inc., Nutley, NJ 07110

ويمكن أن يتم تعريف المزرعة المجهولة من خلال ملاحظة النتائج الإيجابية ، والسلبية للاختبارات التخميرية والبيوكيميائية ، أو باستخدام شفرة خاصة مبرمجة فى الحاسب الآلى . وفى الحالة الأخيرة .. يتم اختصار مجموعة التفاعلات البيوكيميائية فى قيمة تعريفية (ID) مكونه من ٥ أو ٧ خانات رقمية باستخدام مزدوجة رياضية . وهذه الأرقام يتم إدخالها فى الحاسب الآلى لتتم مقارنة نتائجها وإجراء التعريف ، على أساس اختبار الميكروب الأقرب للنتائج best fit ، وهذا الاختبار للأقرب يدخل فى حسابه الاختلافات البيولوجية التى قد تؤدى إلى أخطاء فى طرق التعريف السابقة لهذه الطريقة .

ويمتاز التعريف بالحاسب الآلى بميزات إضافية وهى : أن كل احتمالات التوافيق فى التفاعلات البيوكيميائية تدخل فى الاعتبار ، وبالتالى يمكن الوصول إلى تعريف ميكروب مختلف atypical عن صفات النوع الأصلية .

ولكن هناك بعض العيوب لكل نظام منها : أن دقة بعض الاختبارات موضع تساؤل ، كما أن الوصول للاستنتاجات قد يكون صعبا فى بعض الأحوال ، وقد يكون من الضرورى إجراء اختبارات إضافية بيوكيميائية ، أو سيرولوجية ، أو باستخدام الفيروسات . وقد صممت التجربة التالية بحيث تسمح للطالب بالتعرف على الاختبارات الهامة التى يتم من خلالها تحديد أفراد عائلة البكتيريا المعوية .

أمامك طبقان يحتوى كل منهما على مزرعتين مجهولتين من البكتيريا المعوية . ويجب الحرص أثناء التعامل مع هذه الميكروبات المجهولة حيث إن من بينها ميكروبات مرضية .

الطريقة (أ)

نظام API

١ - أمامك شريطان من API 20E وفهرس تحليلى لنتائج API 20E .

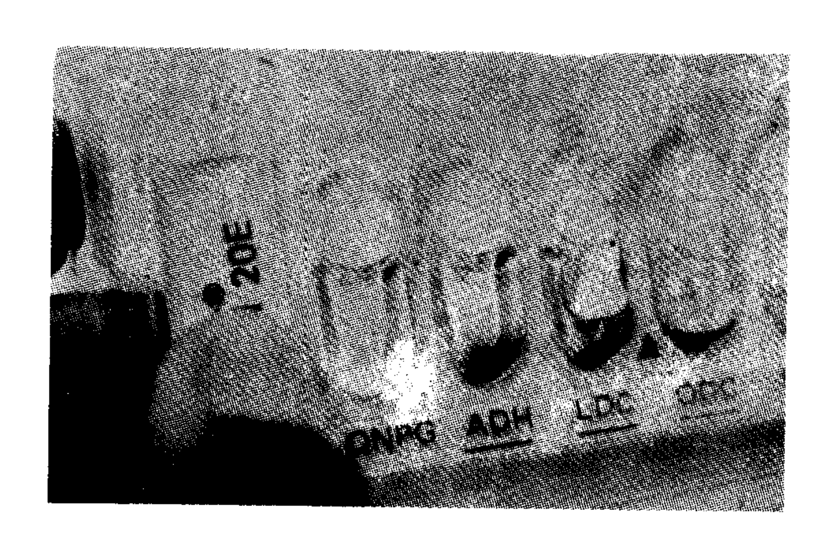
٢ - قم بإعداد صينية وغطاء لكل شريط من شرائط API واكتب عليها اسمك ورقّم المزرعة المجهولة . ضع حوالى ٥ مل ماء حنفية فى كل صينية لتعطى الرطوبة اللازمة أثناء التحضين . افتح غطاء شريطيًّا API 20E وضع كل منهما فى الصينية الخاصة به .

٣ - باستخدام إبرة التلقيح ذات العقدة ، خذ جزءا من نمو المزرعة المطلوبة واستخدمه فى إعداد معلق فى ٥ مل من محلول ملح فسيولوجى معقم (٠,٨٥٪ ملح) .

٤ - لتلقيح أقسام شريط API .. اسحب معلق البكتيريا فى ماصة باستير معقمة . قم بإمالة الصينية التى بها شريط API ، إملأ الأنبوبة الموجودة فى كل قسم من الشريط بالمعلق البكتيرى (انظر شكل (٣)) . إملأ كل من الأنبوبة ، والجزء القمعى فى أقسام اختبارات

CIT ، VP ، Gel ، وذلك حتى تتعرض للأكسجين الجوى ، ويلاحظ أيضاً فى أقسام ADH, LDC, ODC, URE أن يتم ملء الجزء القمعى بعد التلقيح بزيت معدنى معقم باستخدام ماصة ١ مل ، معقمة وذلك لخلق ظروف لا هوائية .

٥ – قم بتغطية غطاء صينية التحضين ، وحضن على ٣٧°م لمدة ١٨ ساعة . وإذا لم تتمكن من قراءة شريط API خلال ١٨ – ٢٤ ساعة .. فإنه يتم تخزين الشريط على درجة ٢ – ٨°م لمدة حتى يمكن فحصه بسهولة .



شكل (٣) : تلقيح شريط API 20E .

٦ – افحص وسجل نتائج كل التفاعلات التى لا تتطلب إضافة دلائل ، وذلك بعد ١٨ ، ٢٤ ساعة .

(أ) إذا أظهرت أنبوبة Glu لوناً أصفر ، ضف ١٠٪ كلوريد حديديك إلى أنبوبة TDA ، ونقطة من كل من ألفانافثول ، KOH إلى أنبوبة VP . اقرأ نتائج الـ VP بعد ١٠ دقائق .

(ب) ضف دليل كوفاكس إلى أنبوبة IND .

٧ – باتباع إرشادات المعيد .. قدر الرقم العددى لكل اختبار ، والتى سوف تمكنك من الوصول إلى الرقم ذى الـ ٧ خانات باستخدام الفهرس التحليلى لنظام API 20E وبالتالى يمكنك تحديد نوع الميكروب .

٨ – إذا تطلبّ الأمر اختبارات أخرى ، خذ البيئات المناسبة ، واجر الاختبارات اللازمة .

الطريقة (ب)

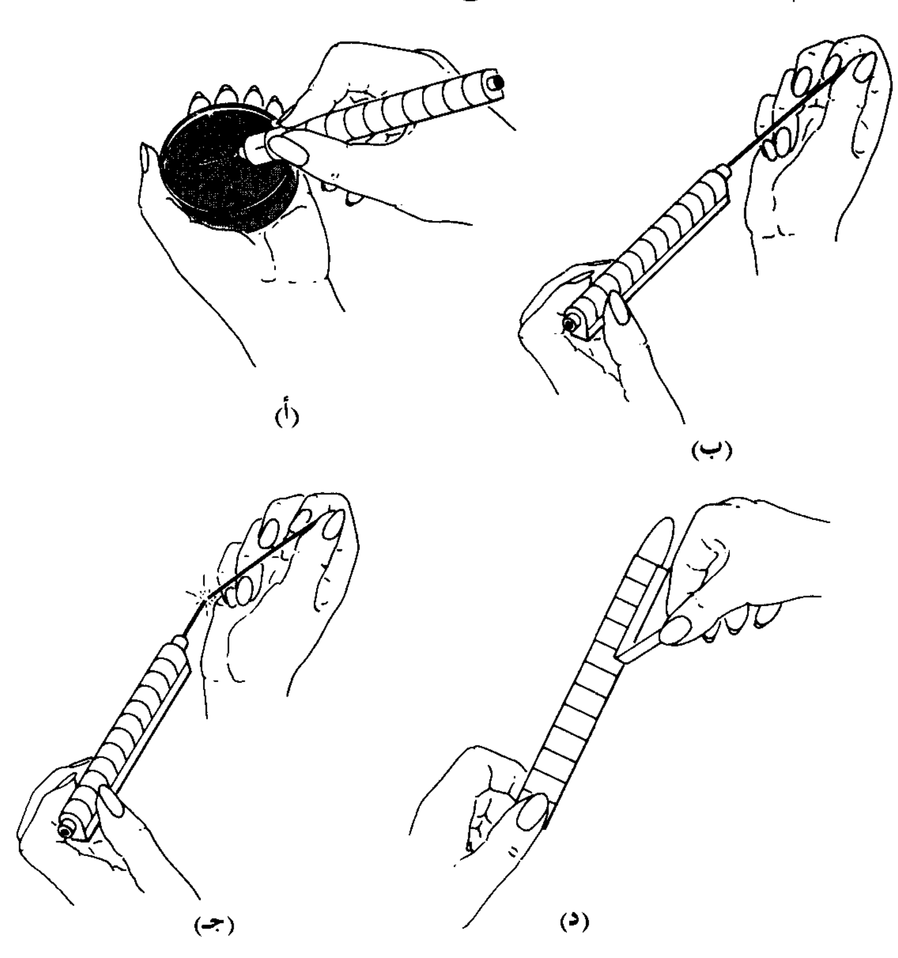
طريقة Enterotube

١ – أمامك أنابيب Enterotube II ونظام للحاسب الآلى وكتيب تعريف .

٢ – انزع غطاء أحد طرفى إحدى أنابيب Enterotube . **لا تعقم بتعريض الإبرة للهب .**

٣ – خذ إحدى المستعمرات المنعزلة بطرف إبرة التلقيح الخاصة بأنبوبة Enterotube (انظر شكل ٤ – أ) .

٤ – لقح أنبوبة Enterotube بلف سلك إبرة التلقيح ، ثم سحب الإبرة خلال كل الاثنى عشر قسمًا من أقسام الأنبوبة وذلك بسحبها مع دورانها (شكل ٤ – ب) .



شكل (٤) : تلقيح أنبوبة Enterotube II .

(أ) خذ مستعمرة معزولة بإبرة التلقيح الخاصة بالأنبوبة .

(ب) لقح الأنبوبة .

(جـ) اكسر الإبرة بعد إعادة إدخال جزء منها .

(د) انزع الشريط الأزرق .

٥ – اعد إدخال الإبرة داخل الأنبوبة ، وذلك بحركة دورانية ، خلال الثلاثة أقسام الأولى منها (أقسام الجلوكوز والليسين والارنثين) حتى تصل إلى قسم H_2S مع الإندول . قم بعد ذلك بكسر الإبرة . وذلك بثنيها عند الحز الموجود عليها ، والذى يكون عندئذ عند طرف أنبوبة Enterotube مباشرة ، ثم تخلص من الإبرة المكسورة (انظر شكل ٤ – جـ) . ويساعد وجود السلك الحديدى داخل الأنبوبة على سيادة الظروف اللاهوائية اللازمة لتخمر الجلوكوز ، ونزع مجاميع الكربوكسيل من الليسين والارنثين فى الثلاثة أقسام الأولى .

٦ – ضع الغطاء على طرف الأنبوبة .

٧ – انزع الشريط الأزرق الموجود على الأنبوبة ، وذلك لتعريض الثقوب الموجودة على الأنبوبة البلاستيكية لإيجاد الظروف الهوائية فى أقسام الأدونيتول ، اللاكتوز ، الأرابينوز ، السربيتول ، VP ، دلكتول – فينيل الانين ، اليوريا ، والسترات (انظر شكل ٤– د) .

٨ – ضع شريط من البلاستيك الشفاف حول قسم الجلوكوز ، وذلك لمنع خروج الشمع نتيجة لتكون كميات كبيرة من الغاز بواسطة بعض البكتيريا .

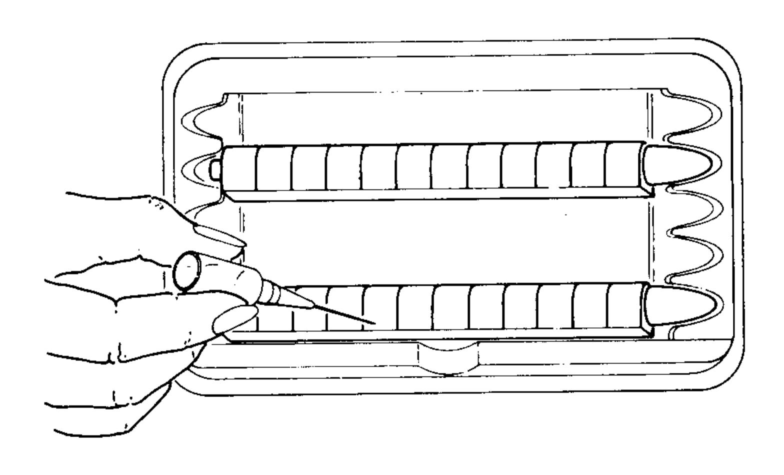
٩ – اعد الخطوات من ٢ – ٨ مستخدما أنبوبة Enterotube II أخرى مع المزرعة الثانية المطلوب تعريفها .

١٠ – لقح أنبوبتى Enterotube على درجة ٣٥ – ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة بحيث توضع الأنبوبة على جانبها المستوى .

١١ – افحص ، وسجل نتائج البيئات المختلفة (فيما عدا الإندول) ، وذلك بمقارنة كل قسم مع شبيهه فى أنبوبة Enterotube غير ملقحة ، والشريط الموضح للألوان الإيجابية الموجود أمامك .

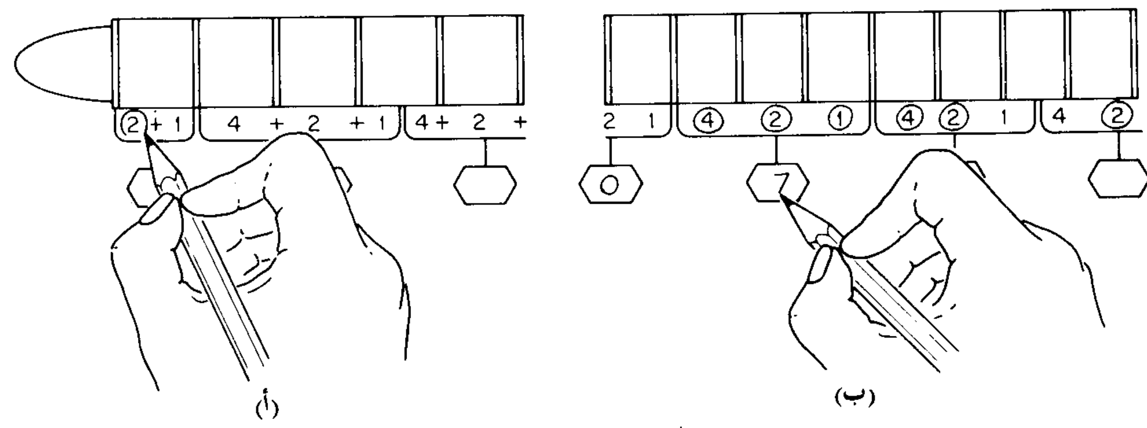
١٢ – قم بإجراء اختبار الإندول وذلك بوضع أنبوبة Enterotube على الحامل ، بحيث يكون قسم الجلوكوز إلى أسفل ، وباستخدام إبرة وحقنة .. ضف ٢ – ٣ نقطة من محلول كوفاكس من خلال الغشاء البلاستيكى الخاص بقسم H_2S – إندول (انظر شكل ٥) . اجعل المحلول يصل إلى سطح الآجار ثم اقرأ النتيجة بعد دقيقة .

١٣ – قم بإجراء اختبار Voges - Proskauer ، وذلك بوضع أنبوبة Enterotube على الحامل بحيث يكون قسم الجلوكوز إلى أسفل ، ثم ضف ٢ نقطة من محلول ٢٠٪ ايدروكسيد بوتاسيوم محتو على ٠,٣٪ كرياتين ، وأيضا ٣ نقط من محلول ٥٪ الفانافثول . ويعتبر تكون لون أحمر خلال ٢٠ دقيقة دليلا على أن الاختبار إيجابى .

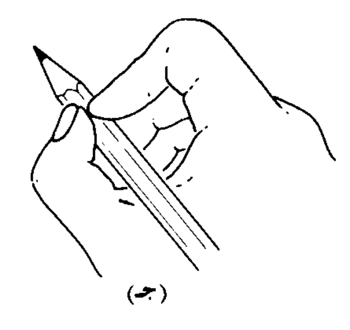


شكل (٥) : اجراء اختبار الأندول .

١٤ – سجل فى تقريرك النتائج الإيجابية ، وذلك بوضع دائرة حول الرقم الموجود أسفل القسم المناسب فى الأنبوبة (انظر شكل ٦–أ)



70762 Klebsiella pneumoniae
70763 Klebsiella pneumoniae



شكل (٦) : تقييم نتائج أنبوبة Enterotube II وتعريف النوع .

(أ) سجل النتائج الإيجابية بوضع دائرة حول رقم القسم الإيجابى .

(ب) اجمع الأرقام المحاطة بدائرة بكل قوس ، وضع المجموع فى المكان المخصص له بأسفل .

(جـ) ابحث عن الرقم المكون من خمس خانات فى كتاب الحاسب الآلى لتعريف المزرعة .

قم بجمع الأرقام الموجودة داخل الدوائر لكل مجموعة فى قوس ، ثم ضع رقم ناتج الجمع فى المكان المخصص له فى أسفل القوس بورقة التقرير (انظر شكل ٦–ب) .

١٥ – اقرأ الخمسة أرقام الموجودة فى الأماكن المخصصة ، لرقم مكون من خمس خانات 5- digit number . ولتعريف الجنس ، أو النوع للبكتيريا المجهولة .. ابحث عن الرقم المكون من خمس خانات – فى الجدول – فى كتاب الحاسب الآلى فى العمود المكتوب عليه ID value (انظر شكل (٦ – جـ) . إذا وجد فى النتيجة أكثر من ميكروب .. فإن الأمر يتطلب إجراء اختبارات أخرى تأكيدية للتعريف النهائى . وتوجد هذه الاختبارات التأكيدية فى العمود الأيمن من كتاب التعريف .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هو المقصود بإصابة الناقهين nosocomial infection ؟

٢ – ما هى الاختبارات الإضافية المطلوب إجرائها ، لتعريف بكتيريا غير معوية باستخدام النظام المتعدد الدقيق ؟

تـدريـــب (٤٦)

التعريف المورفولوجى لبعض أنواع البكتيريا ذات الصفات الخاصة

Morphological Identification of Some Unique Bacteria

من المعروف أنه يوجد حتى فى أصغر وأبسط الكائنات الحية درجات عالية من التعقيد والاختلاف ، وذلك لأن أشكال كل البكتيريا ليست مجرد عصويات أو كرويات أو خلايا حلزونية بسيطة ، كما أن الانقسام فى البكتيريا ليس محدودا فقط فى الانقسام الثنائى البسيط . وسوف يظهر فى هذا التدريب أن الاختلافات الواضحة بين الأنواع المدروسة ليست فقط فى الشكل المورفولوجى ، ولكن أيضا فى الحجم والحركة وميكانيكية التكاثر .

والميكروبات التى سوف تُشاهَد فى هذا التدريب ، تضم مورفولوجيا الميكروبات ذات الحامل أو الساق stalked والمغلفة sheathed وذات الزوائد prosthecate والحلزونية spiral والخيطية filamentous . وهذه تتراوح أبعادها من ٠,٥ إلى ٢٠٠ ميكرومتر – كما أن دورة حياة بعضها تضم مراحل سابحة swarmers ، بينما يكون البعض الآخر جراثيم spores أو حوصلات Cysts . وهناك أنواع موجبة لجرام ، وأنواع سالبة لجرام ، بينما يصعب صبغ البعض الآخر .

طريقة العمل PROCEDURE

سوف يتم إمداد كل مجموعة من الطلاب بعدة مزارع مختلفة غير مُعَرَّفة . وباستخدام ميكروسكوب تباين الأطوار الضوئى (تدريب ٢) وصبغة جرام (تدريب ١٠) ، افحص كل ما يمكنك مشاهدته من هذه الميكروبات . والميكروبات التى أمامك هى بعض الميكروبات الآتية :

Accalomicrobrium, Caryophanon, Caulobacter, Myxococcus, Hyphomicrobium, Rhodospirillum, Streptomyces, Sphaerotillus, and Anabaena (بكتيريا خضراء مزرقة) .

ويمكنك الاستعانة بالكتاب النظرى للحصول على معلومات إضافية ، توضح مصادر هذه الميكروبات ، والعلاقات بينها ، وبين بعضها ، وأهميتها البيئية .

أسـئلة QUESTIONS

١ – ما هى أكبر الكائنات البدائية النواة فى هذا التدريب ؟

٢ – ما هو أصغر الميكروبات فى هذا التدريب ؟

٣ – ما هى الأجناس التى تكون سابحات متحركة ؟

٤ – ما هى الميكروبات الملونة ؟

٥ – ما هى الميكروبات التى تكون جراثيم ؟

٦ – ما هى الميكروبات التى تكون رائحة تشبه الرائحة المميزة للتربة؟

عزل البكتيريا ISOLATION OF BACTERIA

سوف تقوم فى التدريب التالى بعزل أفراد من مجموعات خاصة من البكتيريا . ويتطلب نجاح العزل فهما للوسط الطبيعى والصفات المميزة للمجموعة الميكروبية التى تبحث عنها . وأحسن المصادر للحصول على نوع ما من البكتيريا هو بيئتها الطبيعية ، فعلى سبيل المثال نبحث فى التربة عن *Bacillus* ، وفى الأغذية المتخمرة عن بكتيريا حامض اللاكتيك . ولكى تنتخب وتكثر مجموعة بكتيرية معينة ، لابد أن تعرف الصفات التى تميز هذه البكتيريا عن غيرها من الأنواع التى لا تحصى ، والتى توجد معها فى الوسط . وعلى هذا .. فإنه لعزل نوع من *Bacillus* فإننا نستفيد من خاصة المقاومة الحرارية لجراثيمه الداخلية ، وتستخدم الحرارة للحصول عليه من المصدر الذى نعزل منه . وبعد العزل .. فإن التأكد من سلامة تعريف الجنس أو النوع ، يتطلب أيضا معرفة عميقة لمجموعات البكتيريا – ويعتبر عزل نوع ميكروبى معين من أكثر التحديات أهمية وجاذبية بين مختلف مجالات علم الميكروبيولوجى .

تدريـــب (٤٧)

عزل جنس الباسلس Bacillus Isolation

أفراد هذا الجنس عصويات موجبة لجرام ، هوائية أو اختيارية ، موجبة لاختبار الكاتاليز ، وتكون جراثيم داخلية . ومصادرها الأساسية هى الهواء والمياه والتربة .

ومثل كل عمليات العزل .. فإن طبيعة المصدر الذى يتم العزل منه ، والظروف البيئية ، تعتبران من العوامل التى تحدد صفات الميكروبات التى من المحتمل عزلها ، ومثالاً على ذلك .. نجد أن لدرجة الحرارة الاعتيادية للمصدر دوراً فى تحديد درجة الحرارة المثلى لعزلتك . وفى عزل الباسلس .. نجد أنه بينما تعتبر التربة المصدر الجاهز لعزل الأنواع المحبة للحرارة المتوسطة ، والمحبة للحرارة المرتفعة ، إلا أن أخذ عينة من كومة سماد عضوى ساخنة يعتبر مصدرا أحسن لعزل السلالات المحبة للحرارة المرتفعة .

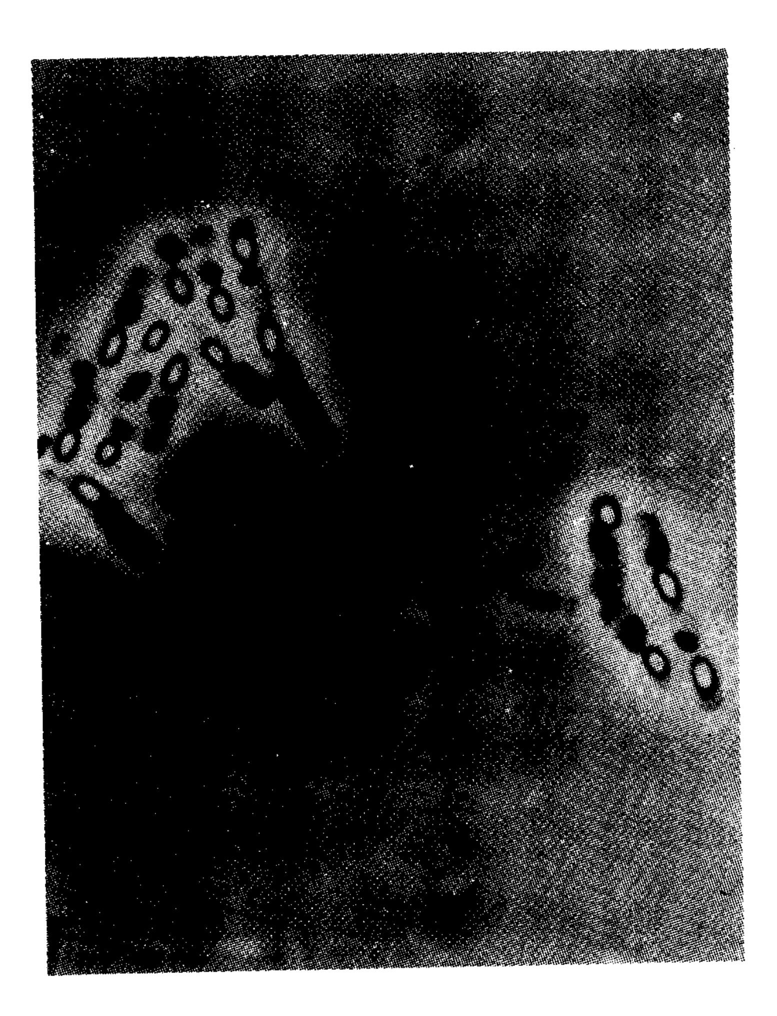
ويتم معاملة المصدر المطلوب عزل الباسلس منه حراريا لقتل الخلايا الخضرية . ولاتُبقى هذه المعاملة الحرارية الجراثيم الداخلية حيه فقط ، ولكنها أيضا تنشطها للإنبات (وتسمى هذه الظاهرة الصدمة الحرارية Heat shocking) . وعندما يتم تحضين العينة بعد ذلك .. تنمو الميكروبات ؛ مما يؤدى إلى زيادة أعداد الميكروبات التى تكون جراثيم داخلية ويسهل عزلها . وتلعب درجة حرارة التحضين دورها فى انتخاب الميكروبات التى تعتبر هذه الدرجة مثلى لها . وعلى ذلك .. فإذا كنت ترغب فى عزل سلالة محبة للحرارة من الباسلس ؛ فيجب أن تستخدم للتحضين درجة ٥٥° م ، أو أعلى .

ويتم عزل سلالة نقية بالتخطيط فى الأطباق ، ثم تحضن الأطباق هوائيًّا لتثبيط البكتيريا المكونة للجراثيم الداخلية التابعة لجنس *Clostridium* . ويتم العزل من مستعمرات تعطى ميكروبات عصوية موجبة لإنزيم الكاتاليز ، متحركة ، موجبة لجرام . ثم يتم التأكد من أنها باسلس بفحصها لوجود الجراثيم الداخلية (انظر شكل ١) .

طريقة العمل PROCEDURE

الإكثـــار Enrichment

١ – ضع المصدر الذى سوف تعزل منه فى أنبوبة بويون مغذى ، وسخنها على حمام مائى على درجة ٨٠° م لمدة ١٠ دقائق (أو تعرض للبخار على درجة ١٠٠° م لمدة ٥ دقائق) .



شكل (١) : شكل الباسلس *Bacillus* **تحت الميكروسكوب ، وتظهر فيه الجراثيم الداخلية والأجسام القريبة من الجرثومة Parasporal bodies**
(مهداه من Dr A. Yousten)

٢ – حضن المزرعة التى عوملت بالحرارة على درجة ٣٠ ، ٣٥ ، ٥٥° م (يعتمد ذلك على ما تريد أن تعزل : ميكروبا محبًّا للحرارة المتوسطة أم المرتفعة) وذلك حتى الدرس العملى التالى .

العـــزل Isolation

٣ – بعد التحضين .. خطط جزءا من مزرعة الإكثار على أطباق آجار مغذى ، وحضنها على الدرجة التى اخترتها حتى الدرس العملى التالى .

٤ – افحص عدة مستعمرات منعزلة جيدا بالنسبة لاختبار الكاتاليز (تدريب ٣٩) . اعمل تحضيرا رطباً ، واختبره ميكروسكوبيا بالنسبة للشكل ، والحركة .

٥ – بعد أن تحدد المستعمرة التى أعطت عصويات موجبة لاختبار الكاتاليز .. لقح جزءا منها فى أنبوبة بويون مغذى ، وبعد تقليب جزء المزرعة فى البويون ، استخدمه فى تخطيط طبق آجار مغذى . حضن كل من أنبوبة البويون والطبق على درجة الحرارة التى اخترتها لمدة ٢٤ ساعة .

تأكيد النتائج Confirmation

٦ – بعد التحضين .. افحص الطبق لوجود مستعمرات منعزلة لها نفس صفات العزلة الأصلية ، وأيضا أجر اختبار الكاتاليز للمستعمرة .

٧ – اعمل تحضيرا بصبغة جرام وآخر بصبغة الجراثيم (تدريب ١٢) ، من كل من البويون المغذى ومن المستعمرات المنعزلة على طبق الآجار المغذى . فإذا كانت العزلة عصويات موجبة لاختبار الكاتاليز موجبة لجرام ، استمر فى تحديد صفاتها . ولأن كل العزلات لا تستطيع تكوين الجراثيم الداخلية فى البيئات المعملية العادية ، فيجب ألا تفحصها لتكوين الجراثيم الداخلية عند هذه الخطوة ، ويلاحظ أن أغلب أنواع الباسلس يكون الجراثيم الداخلية عندما تنمو فى بيئات مضافًا إليها منجنيز .

تحديد الصفات Characterization

٨ – لقح البيئات الآتية من مزرعة البويون المغذى للميكروب : آجار المنجنيز المائل ، مزرعة مهتزة من آجار الجلوكوز وبروم كريزول بريل ، وأطباق آجار النشا وآجار الكازين ، وحضنها عند درجة الحرارة المطلوبة . لقح أيضا أربع أنابيب بويون مغذى ، وحضن واحدة منها عند كل من درجات الحرارة التالية : ٤ ، ٣٠ ، ٤٥ ، ٥٥° م .

٩ – بعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة .. اعمل صبغة الجراثيم من مزرعة آجار المنجنيز واختبرها ميكروسكوبيا لوجود الجراثيم الداخلية . فإن وجدت .. لاحظ الحجم والشكل وموضعها فى الخلية .

١٠ – بعد التحضين لمدة ٤٨ ساعة :

(أ) افحص مزرعة آجار الجلوكوز وبروم كريزول بربل للتخمر وعلاقتها بالأكسجين .

(ب) اختبر أطباق آجار النشا لتحلل النشا (تدريب ٣٤) ، وأطباق آجار الكازين لتحلل الكازين (تدريب ٣٥) .

(جـ) افحص أنابيب البويون المغذى للنمو عند درجات الحرارة المختلفة ، وحدد درجة الحرارة المثلى ، ومدى النمو الحرارى للعزلة .

١١ - على أساس الصفات المدروسة .. هل يمكنك تعريف نوع الـ *Bacillus* المعزول ؟

أسـئلة QUESTIONS

١ - لماذا يتم تسخين بيئة الإكثار الخاصة بجنس *Bacillus* ؟

٢ - لماذا يتم تحضين بيئة إكثار الـ *Bacillus* ، قبل استخدامها فى تلقيح أطباق الآجار للعزل ؟

٣ - لماذا يتم تلقيح مزرعة الـ *Bacillus* على آجار المنجنيز ؟

٤ - لماذا قد تظهر بعض مزارع *Bacillus* كما لو كانت سالبة للكاتاليز ؟

٥ - ما هو الجسم فوق الجرثومة parasporal body ؟

تدريــب (٤٨)

عزل السيدومونادات Pseudomonad Isolation

أفراد هذه المجموعة عصويات سالبة لجرام ، متحركة عادة بفلاجلم (سوط) واحد طرفى ، وهذه الميكروبات هوائية رغم أن بعضها يمكنه النمو لاهوائيا مع استخدام النترات بدلا من الأكسجين كمستقبل نهائى للإلكترونات . وهى لا تخمر السكريات ، ولكن تمثلها ، كما تمثل عديداً من المركبات العضوية الأخرى تمثيلاً تأكسديا . وترتبط قدرتها مع طبيعتها التأكسدية على أكسدة الأمينات الحلقية مثل بارا أمينو داى ميثيل انيلين P- aminodimethyl - aniline لتكون ناتجا نهائيا ملونا . وترتبط قدرتها على أكسدة الأمينات الحلقية بوجود Cytochrome c فى سلسلتها التنفسية ، وهذا هو الأساس فيما يسمى باختبار الأكسيديز oxidase test ، الذى يستخدم فى تعريف السيدومونادات الموجبة لاختبار الأكسيديز . وهذه البكتيريا متنوعة فى نشاطها التمثيلى ، وهى واسعة الانتشار .. فتوجد فى التربة ، وماء البرك ، والمجارى ، والبيض ، وقشر البيض ، والسوائل المعتقة ، واللبن الحليب الخام ، والأسماك ، والقشريات ، والخضروات الورقية ، والدواجن .

ولعزلها سوف تستفيد من مقاومة أنواع السيدومونادات لعدد كبير من المضادات الحيوية ، وذلك بزراعة المصدر الذى سوف تعزل منه على أطباق بيئة آجار تحتوى على : المضادات الحيوية ، النوفوبيوسين ، والبنسلين ، والسيكلوهكسيميد (Novobiocin, Penicillin, Cycloheximide) . ولأن النوفوبيوسين يثبط الميكروبات الأخرى السالبة لجرام ، والبنسلين يثبط الأنواع الموجبة لجرام ، والسيكلوهكسيميد يثبط الفطريات .. فإن هذه البيئة تعتبر انتقائية لحد كبير فى إكثار السيدومونادات . ويمكن تعريف مستعمرات السيدومونادات بأنها تلك التى تحتوى على بكتيريا

عصوية سالبة لجرام موجبة لأختبار الأكسيديز ، والتى لا تخمر الجلوكوز . ويمكنك أن تؤكد تعريفك للسيدومونادات المعزولة بالاستناد إلى درجة حرارة النمو ، وتكوين الصبغة ، ونشاط إنزيمى الفوسفوليباز phospholipase والجيلاتيناز gelatinase .

طريقة العمل PROCEDURE

الإكثار Enrichment

١ – لكى تجعل الأعداد المحدودة من الميكروبات فى المصدر التى سوف تعزل منه تنمو ، يجب تحضينها عند درجة ٢٠°م لمدة ٢٤ ساعة ، وسوف يساعد هذا الإجراء على فصل البكتيريا عن المادة الصلبة ، ويساعد أيضا فى سهولة توزيعها أثناء تخطيط الأطباق .

٢ – بعد التحضين .. يتم التخطيط من المصدر المطلوب العزل منه على أطباق بيئة آجار نوفوبيوسين – بنسلين – سيكلوهكسيميد ، ثم تحضن الأطباق عند درجة ٢٠°م (أو أى درجة أخرى مرغوبة) ، لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة .

العــزل Isolation

٣ – اعمل تحضيرا مبتلا من مستعمرة أو اثنتين وافحصها ميكروسكوبيا ، وعندما تحدد مستعمرة تحتوى على بكتيريا عصوية متحركة ، اجر اختبار الأكسيديز على جزء من المستعمرة باستخدام طريقة ورق الترشيح (تدريب ٤٠) . وإذا كانت المستعمرة إيجابية لاختبار الأكسيديز وشكل الخلايا مناسبًا ، فيعتبر هذا اختبارًا احتماليا بأن الميكروب تابع للسيدومونادات .

٤ – بعد تحديد المستعمرة العصوية الإيجابية للأكسيديز .. لقح منها أنبوبة بويون مغذى . قم أيضا بعمل معلق من جزء من المستعمرة فى بويون معقم واستخدمه فى تخطيط طبق آجار مغذى ، ثم حضن كل منهما على درجة ٢٠°م لمدة ٢٤ ساعة .

تأكيد النتائج Confirmation

٥ – اختبر طبق الآجار المغذى التأكيدى لنقاوة المزرعة ، ووجود مستعمرات لها صفات مثالية .

٦ – من مزرعة البويون المغذى .. اعمل شريحة بصبغة جرام ، وذلك للتأكد من أن الميكروب الذى أعطى اختبار أكسيديز إيجابيًا فى الخطوة ٣ هو ميكروب عصوى سالب لجرام ، وليس ميكروبا إيجابيا للأكسيديز ، موجبًا لجرام تابعاً لجنس *Bacillus* .

٧ - من مزرعة البويون .. لقح أنبوبتين من بيئة آجار الأكسدة والاختزال (OF) بالوخز حتى قرب قاع الأنبوبة . قم بتغطية إحدى الأنبوبتين بالفاسبار ، وحضن كلا الأنبوبتين عند ٢٠°م لمدة ٤٨ ساعة أو أكثر (تدريب ٢٣) .

٨ - افحص أنابيب بيئة الأكسدة والاختزال لتكون حموضة من الجلوكوز ، وذلك بتغير لون دليل البروم ثيمول بلو إلى اللون الأصفر . وتتميز مجموعة السيدومونادات التأكسدية بأنها لا تكون إلا كمية قليلة من الحامض على السطح فقط فى الأنبوبة غير المغطاة بالفاسبار ، ولاتكونه فى الأنبوبة التخمرية أو الأنبوبة المغطاة . ويمكن أن تتأكد من تكون غاز من ظهور فقاعات محبوسة فى الآجار ، كما يمكن التأكد من الحركة بوجود عكارة النمو فى الأنبوبة بعيدا عن خط الوخز .

يمكن أيضاً التأكد من صفات السيدوموناد (انظر جدول ١) ، بدراسة إمكانية حدوث النمو عند درجات حرارة : ٥ ، ٣٥ ، ٤١°م ، وأيضاً باختبار اختزال النترات (تدريب ٧٤) وإنتاج إنزيم Phospholipase C على بيئة آجار صفار البيض (تدريب ٣٨) ، وتحلل الجيلاتين (تدريب ٣٦) وأيضاً إنتاج صبغات البيوسيانين Pyocyanin ، والفلورسين Fluorescein ، ويعتبر إنتاج هذه الصبغات صفات مميزة لبعض سلالات جنس *Pseudomonas* .

ويمكنك فحص إنتاج هذه الصبغات ، باستخدام بيئات آجار خاصة مثل : Tech agar (أو Pseudomonas P agar) ، بيئة Flo (أو Pseudomonas F agar)* . وصبغة البيوسانين صبغة خضراء مزرقة ذائبة فى الماء . وتتكون هذه الصبغة خلال ٦ - ٧ أيام على بيئة Tech agar . أما الفلورسين .. فهى صبغة تتفلور fluoresces عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية . ويتم تشجيع إنتاج صبغة الفلورسين ، وذلك بالتنمية على بيئة آجار Flo ، لأن هذه البيئة تتميز باحتوائها على نسبة محدودة من الحديديك ، وسوف تتفلور المزارع المنتجة للفلورسين المنماة على أطباق آجار Flo عندما يفتح الطبق ، ويفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية . ولتجنب الخطأ فى تمييز تكون الصبغة .. فإنه من المفيد أن تقارن عزلتك مع أنابيب مقارنة سالبة وأخرى موجبة لإنتاج الصبغة .

أسـئلة QUESTIONS

١ - اشرح الغرض من استخدام بيئة آجار النوفوبيوسين - بنسلين - سيكلوهكسيميد فى عزل السيدومونادات .

٢ - قد تنمو بعض الميكروبات الموجبة لاختبار الأكسيديز غير التابعة لمجموعة السيدوموناد

* هذه البيئات يمكن الحصول عليها تجاريا من شركة **Baltimore Biological Labs at Cockeysville, MD 21030** ، ومن شركة **Difco Labs, Detroit, MI 48232** .

مثل : *Neisseria, Streptomyces* على بيئة المضادات الحيوية الانتقائيّة . كيف يمكنك استبعاد هذه الميكروبات أثناء العزل ؟

٣ – لماذا تتكون صبغة الفلورسين على بيئة آجار Flo ولا تتكون على بيئة آجار العدد الكلى ؟

٤ – ما هو الإنزيم الذى يحدد وجوده اختبار الأكسيديز ؟

جدول (١) : تفاعلات بعض أنواع جنس *Pseudomonas*.

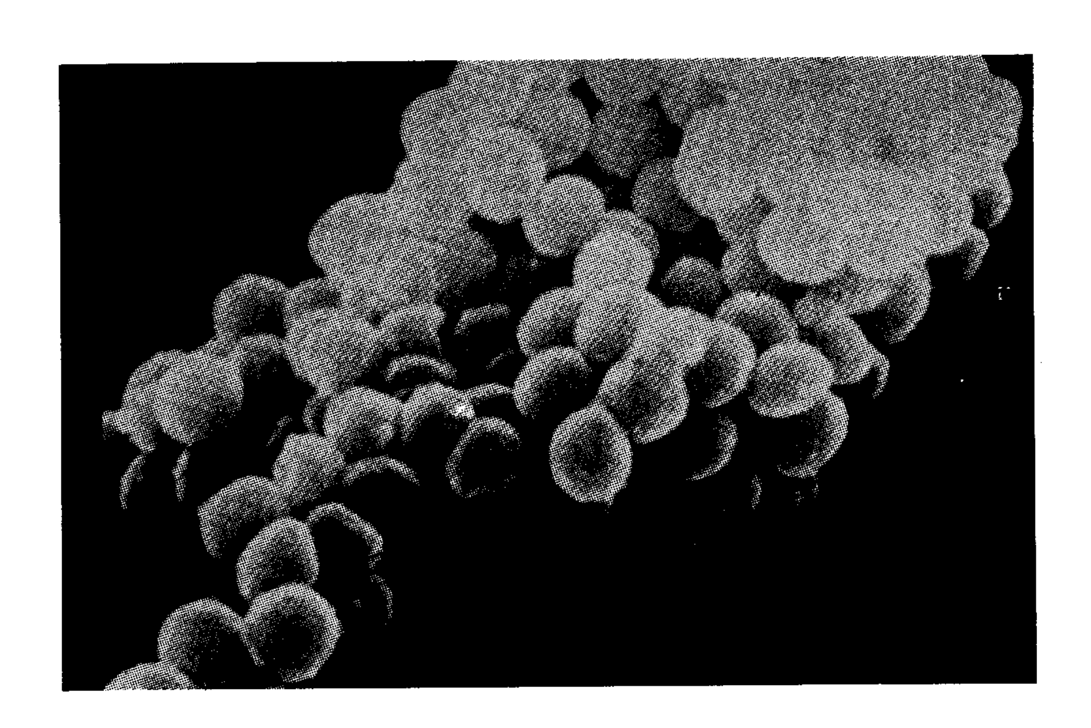
الاختبار	*P. aeruginosa*	*P. fluoreseens*	*P. putida*
النمو عند ٤° م	–	+	±
النمو عند ٤١° م	+	–	–
إنتاج صبغة البيوسيانين	+	–	–
إنتاج صبغة الفلورسين	+	+	+
إنتاج الفوسفوليباز	–	+	–
تحلل الجيلاتين	+	+	–

تدريب (٤٩)

عزل البكتيريا العنقودية Staphylococcus Isolation

تضم عائلة Micrococcaceae جنسى : *Staphylococcus* ، *Micrococcus* ، وهى ميكروبات كروية مقاومة للملوحة ، موجبة لجرام ، موجبة للكاتاليز ، غير متحركة . وجنس الميكروكوكس *Micrococcus* هوائى حتمًا ، تتجمع خلاياه فى تجمعات غير منتظمة ، أو فى مجموعات رباعية ، أو فى مكعبات . أما جنس *Staphylococcus* فهو لاهوائى اختيارى ، يكون حامضًا بدون غاز من الجلوكوز ، ويوجد فى تجمعات غير منتظمة مميزة (انظر شكل ١) .

والمصدر الأساسى لجنس *Micrococcus* هو التربة ، والهواء ، والماء العذب ، والجلد . بينما يوجد *Staphylococcus* على الجلد ، والغشاء المخاطى للحيوانات ذوات الدم الحار وفى بعض الأغذية ، والسوائل المعتقة .



شكل (١) : صورة بالميكروسكوب الإلكترونى الماسح لبكتيريا *Staphylococcus* (× ١٠,٠٠٠)
(عن معامل .Stem laboratories, Inc)

وطريقة الإكثار البسيطة لجنس Staphylococcus ، هى زراعة المصدر المطلوب العزل منه لاهوائيا فى بيئة تحتوى على ٧٪ ملح كلوريد صوديوم . ويثبط الضغط الأسموزى العالى لهذه البيئة الميكروبات الحساسة للضغط الأسموزى المرتفع . أما الزراعة اللاهوائية .. فإنها تستبعد الميكروبات الهوائية التابعة لـ *Bacillus* ، *Micrococcus* . تتم تنقية المزرعة بالتخطيط من مزرعة بويون الإكثار ، ويتم بعد ذلك اختبار مستعمرة تحتوى على ميكروبات كروية موجبة للكاتاليز ، موجبة لجرام ، تخمر الجلوكوز لاهوائيا .

طريقة العمل PROCEDURE

الإكثـــار Enrichment

١ - لقح المادة المطلوب العزل منها فى بويون يحتوى على ٧٪ ملح كلوريد صوديوم ، ثم قم بتغطية الأنبوبة بالفاسبار .

٢ - حضن على ٣٠°م لمدة يومين .

٣ - بعد التحضين .. خطط جزءاً منه على طبق بيئة آجار العد الكلى ، وحضن على ٣٠°م لمدة يومين .

العــزل Isolation

٤ – افحص مستعمرات منعزلة من الأطباق المخطوطة لاختبار الكاتاليز (تدريب ٣٩) وادرس شكل الميكروب – ميكروسكوبيا – فى تحضير رطب .

٥ – إذا أمكنك تحديد مستعمرة ميكروبات كروية موجبة للكاتاليز ، لقح منها أنبوبة بويون مغذى – اعمل معلقًا من جزء من المستعمرة فى بويون معقم ، واستخدمه فى تخطيط طبق من بيئة آجار العد الكلى . حضن على ٣٠° م لمدة ٢٤ ساعة .

تأكيد النتائج Confirmation

٦ – بعد التحضين .. اختبر الطبق المخطوط لتحديد مستعمرة منعزلة نقية . اعمل شريحة بصبغة جرام من أنبوبة البويون المغذى .

٧ – إذا كانت عزلتك عبارة عن ميكروبات كروية فى تجمعات غير منتظمة موجبة لجرام ، لقح مزرعة مهتزة من بيئة آجار الجلوكوز المحتوية على بروم كريزول بربل من مزرعة البويون المغذى ، وحضن على ٣٠° م لمدة ٥ أيام .

٨ – افحص المزرعة المهتزة لتخمر الجلوكوز ، فإذا كانت عزلتك الكروية الموجبة للكاتاليز الموجبة لجرام قادرة على تخمير الجلوكوز لاهوائيا ، فإنك تكون قد عزلت عزلة من جنس *Staphylococcus* . يمكنك بعد ذلك تعريف النوع المعزول (انظر جدول ١) ، وذلك باختباره لتخمير المانيتول (تدريب ٣٣) ، والحساسية للنوفوبيوسين (تدريب ٣٠) ونشاط إنزيمى : الديزوكسى ريبونيوكلياز deoxyribonuclease ، والكوأجيولاز Coagulase (تدريب ٧٦) . وإنتاج هذين الإنزيمين وإنتاج الحامض من المانيتول ، وإنتاج صبغة صفراء أو برتقالية يرتبط ارتباطاً كبيرًا مع النوع المسبب للمرض *Staphylococcus aureus* .

جدول (١) : تفاعلات البكتيريا العنقودية .

الاختبـــار	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*S. saprophyticus*
نشاط إنزيم **Coagulase**	+	–	–
نشاط انزيم **DNase**	+	–	–
الحساسية للنوفوبيوسين	حساس	حساس	مقاوم
تخمر المانيتول	+	–	–

أســـئلة — QUESTIONS

١ – ما هى الأجناس التى قد تنمو عادة على بيئة إكثار الـ *Staphylococcus* ؟

٢ – ما هى المدة – بالساعات – التى يحتاجها المشتغل بالميكروبيولوجيا الطبية لإجراء اختبار الكواجيولاز Coagulase ؟

٣ – ما هى مادة التفاعل لاختبار الـ Coagulase ؟

٤ – كيف تظهر أنابيب المزرعة المهتزة لبيئة الجلوكوز والبروم كريزول بربل الملقحة بالـ *Staphylococcus* بعد ٥ أيام ؟

تـدريــب (٥٠)

عزل بكتيريا حامض اللاكتيك — Lactic Acid Bacteria Isolation

بكتيريا حامض اللاكتيك عبارة عن ميكروبات كروية أو عصوية ، موجبة لجرام ، تخمر الكربوهيدرات أساساً لإنتاج حامض اللاكتيك . وهى بكتيريا سالبة لاختبار الكاتاليز ، محبة للهواء بنسبة قليلة ، أو لاهوائية اختيارية ، وتوجد بصفة عادية فى منتجات الألبان ، والأغذية المتخمرة ، وفى الفم ، والقناه الهضمية للإنسان ، والحيوان .

ولعزل هذه البكتيريا .. تستفيد من الميزة المعروفة فى هذه الميكروبات ، وهى أنها تخلو من أنواع السيتوكروم ، وعلى هذا .. فإنها غير حساسة لمثبطات السيتوكروم ، مثل : الازيد Azide ، بينما تثبط هذه المادة الميكروبات الأخرى التى يعتمد نموها على التنفس المرتبط بالسيتوكروم . وعلى هذا .. فإنه بوضع هذه المثبطات فى بيئة غذائية غنية تحتوى على كربوهيدرات قابلة للتخمر كمصدر للطاقة ، فإننا بهذا نكثر بكتيريا حامض اللاكتيك . ويمكن التعرف على مستعمرات بكتيريا حامض اللاكتيك النامية على مثل هذه البيئة بأنها بكتيريا عصوية أو كروية سالبة للكاتاليز ، موجبة لجرام ، لاتكون جراثيم داخلية .

طريقة العمل — PROCEDURE

الإكثـــار — Enrichment

١ – لقح أنبوبتين بيئة مرق مستخلص الخميرة والتربتون والأزيد(*) بمادة من مصدرين مختلفين . (إذا كنت ترغب فى عزل لاكتوباسلس Lactobacilis ، لقح أنابيب بويون(**) all- purpose

(*) يضاف إلى بيئة مستخلص الخميرة والتربتون ٠,٢ جم أزيد صوديوم / لتر (المترجمان) .

(**) يضاف إلى بيئة مرق APT ٠,٢ جم أزيد صوديوم / لتر (المترجمان) .

tween (APT)- azide - broth) . من الأنسب أن يتم التلقيح بكمية كبيرة من المصدر المطلوب العزل منه ، ومثالاً على ذلك عندما تستخدم اللبن الحليب الخام فى العزل استخدم ٥ غمسات ابرة .

٢ – قم بتغطية أنابيب مزارع البويون بالفاسبار ، وحضنها لمدة ٢٤ أو ٤٨ ساعة عند درجة حرارة قريبة من درجة حرارة جو المصدر المطلوب العزل منه .

العــزل Isolation

٣ – افحص تحضيرا ، مبتلا من مزرعة الإكثار بالميكروسكوب (تدريب ٢) ، أو بصبغة بسيطة (تدريب ٨) . وباستخدام المزرعة التى أعطت أعلى نمو ، خطط طبقًا من بيئة آجار APT المحتوية على كربونات كالسيوم . ويعمل وجود كربونات الكالسيوم كمنظم للحموضة وأيضا يوضح المستعمرات المنتجة للحامض ، حيث إن الحامض الناتج يؤدى إلى تكون هالة رائقة حول المستعمرات نتيجة إذابة كربونات الكالسيوم . حضن الطبق المخطوط لمدة ٤٨ ساعة على نفس الدرجة التى تستخدم فى الإكثار .

٤ – بعد التحضين .. إجر اختبار الكاتاليز (تدريب ٣٩) على خلايا إحدى المستعمرات المنعزلة ، وحدد مستعمرة سالبة لإنزيم الكاتاليز . من هذه المستعمرة .. لقح أنبوبة بويون Strepbase ، أو APT . اعمل معلقًا من جزء من المستعمرة فى بويون معقم ، واستخدمه فى تخطيط طبق آجار APT ، وحضن الجميع على درجة الحرارة المناسبة .

تأكيد النتائج Confirmation

٥ – بعد ٢٤ ساعة من التحضين .. اعمل شريحة بطريقة جرام من مزرعة البويون . افحص ميكروسكوبيا لشكل الخلايا وترتيبها ولنتيجة صبغة جرام لعزلتك (انظر شكل ١) .

٦ – بعد تحضين طبق APT المخطوط .. ادرس نقاوة المستعمرات وصفات المستعمرة ، واجر اختبار الكاتاليز على إحدى المستعمرات المنعزلة .

٧ – من مزرعة البويون .. لقح مزرعة مهتزة من بيئة آجار BCP-APT . قم بتغطية الآجار فى الأنبوبة المهتزة بطبقة من الفاسبار . وإذا كانت عزلتك بكتيريا عصوية ، لقح أيضا أنبوبة آجار منجنيز مائل . حضن كلتا الأنبوبتين عند درجة الحرارة المطلوبة لمدة ٤٨ ساعة .

٨ – افحص أنبوبة آجار APT المهتزة لتكون غاز . سوف تُكوِّن الميكروبات ذات التخمر المختلط غازًا أسفل طبقة الفاسبار .

شكل (١) : صورة بالميكرسكوب الإلكترونى الماسح لسلاسل بكتيريا *Streptococcus pyogenes* (١٠,٠٠٠ ×) (عن معامل Stem Laboratories, Inc.) .

٩ - إذا كانت عزلتك عصوية ، اعمل شريحة بصبغة الجراثيم من آجار المنجنيز المائل ، وذلك للتأكد من أن العزلة ليست من النوع المكون للجراثيم الداخلية .

١٠ - على أساس من الصفات المورفولوجية والتخمرية ، حدد الجنس للبكتيريا التى عزلتها (انظر جدول ١) .

جدول (١) : التفرقة بين أفراد بكتيريا حامض اللاكتيك .

الجنـــــس	شكل الخلايا وترتيبها	التخمـــر
Streptococcus	كرويات فى سلاسل	غير مختلط Homo
Leuconostoc	كرويات فى سلاسل	مختلط Hetero
Pediococcus	كرويات فى تجمعات رباعية	غير مختلط Homo
Lactobacillus	عصويات	مختلط وغير مختلط

أســــئلة QUESTIONS

١ - لماذا تعامل البيئات الخاصة ببكتيريا حامض اللاكتيك بالبخار قبل استخدامها ؟

٢ – ما هو الغرض من التغطية بالفاسبار فى بيئات إكثار بكتيريا حامض اللاكتيك ؟

٣ – متى تكون طريقة الأنبوبة الشعرية لإجراء اختبار الكاتاليز أكثر ملاءمة ؟

٤ – لماذا تضاف كربونات الكالسيوم فى بعض بيئات تنمية بكتيريا حامض اللاكتيك فى أطباق ؟

الباب العاشر

التغيرات والطفرات والاتحادات الوراثية البكتيرية

BACTERIAL VARIATION, MUTATION, AND RECOMBINATION

تحدث بالميكروبات ــ مثل غيرها من الأحياء ــ تغيرات فى صفاتها . ورغم أن دراسة المزارع النقية للبكتيريا قد تدفعك للاعتقاد بأن خلايا المزرعة جميعها متشابهة ، إلا إنه توجد داخل المجموعة طفرات من الخلايا تختلف صفاتها فى كثير من النقاط عن صفات الخلايا الأصلية . وأثناء نمو المزرعة البكتيرية .. تتكون طفرات بمعدل منخفض جدا ــ قد يصل إلى خلية واحدة من كل ١٠ مليون خلية . وتختلف الطفرات عن خلايا الأباء اختلافاً ما مثل : فقد القدرة على تخمير سكر معين ، أو فقد القدرة على تكوين توكسين ، أو ظهور المقاومة لفعل دواء معين . والصفة المتغيرة صفة ثابتة ، تظهر فى جميع الخلايا التى تنتج عن الطفرة . وتعكس الصفات الثابتة المورثة من هذا النوع تغيرات فى الجهاز الوراثى ، أو ما يسمى بالتغير فى الطرز الجينى genotype للميكروب . أما التغير الملاحظ فى الصفات المورفولوجية ، أو الفسيولوجية ، الناتج عن التغير فى المادة الوراثية ، فإنه يسمى تغيراً فى الطرز الشكلى phenotypic variation . والتغير فى الطرز الشكلى يكون عادة تعبيراً عن تغير حدث فى الطرز الجينى . ومع هذا .. فإن التغير الملاحظ فى نشاط الخلية ، قد يعزى فقط إلى مؤثرات بيئية من الوسط الذى يعيش فيه الميكروب . فمثلا .. نجد أن الخلايا قد تنتج إنزيما يعمل على تمثيل مادة غذائية مطلوبة كحامض أمينى غير متوفر فى البيئة ، فإذا ما تواجد هذا الحامض فى الوسط الذى يعيش فيه الميكروب ، فقد يحدث نوع من تنظيم إنتاج الإنزيم (التثبيط العكسى Feedback inhibition) ، يؤدى إلى إيقاف إنتاج هذا الإنزيم . وعلى عكس الطفرة التى تحدث فى خلية واحدة من خلايا النسل progeny .. نجد أن التثبيط العكسى ، وغيره من نظم تنظيم التمثيل ، يحدث فى جميع خلايا المزرعة استجابة للتغيرات البيئية .

وعلاوة على الطفرات .. فقد تحدث تغيرات فى التركيب الوراثى للبكتيريا ، نتيجة لانتقال مادة وراثية من خلية مانحة donor إلى خلية مستقبلة recipient . وهناك ثلاثة أنواع من طرق انتقال المادة الوراثية فى البكتيريا وهى : التحول الوراثى Transformation ، واالتزاوج Conjugation والاستقطاع Transduction : ففى حالة التحول الوراثى ينتقل جزء حر ، أو عار من الـ DNA ، من خلية متحللة مانحة إلى خلية مستقبلة ويتحد معها . أما التزاوج .. فهو يعنى انتقال الـ DNA من خلايا التصاق

فسيولوجى شديد ، بين خلية مانحة ، وخلية مستقبلية . أما الاستقطاع فهو انتقال مادة وراثية محمولة على فيروس بكتيرى . وانتقال المادة الوراثية سواء بالتحول ، أو التزاوج ، أو الاستقطاع ، قد يتبعه اتحاد وراثى rocombination للجزء من الحامض النووى DNA المنقول مع جينوم **genome** الخلية المستقبلة . فى كل من طرق انتقال الحامض النووى المذكورة ، يحدث انتقال لجزء فقط من جينوم الخلية المانحة إلى الخلية المستقبلة .

ويظهر أن هذه الصور من تبادل المادة الوراثية تحدث بمعدل منخفض ، وقد أمكن ملاحظتها فقط بين عدد قليل من أنواع البكتيريا . ولكن بصرف النظر عن هذا .. فإن انتقال المادة الوراثية والاتحادات الوراثية قد يؤدى إلى تغير فى صفات الخلية البكتيرية وفى نسلها مثل : الصفات الكيموحيوية ، أو القدرة على إحداث المرض ، أو المقاومة للمضادات الحيوية .

تدريب (٥١)

التغيرات البكتيرية **Bacterial Variation**

يمكن النظر إلى خلية الميكروب ، على أساس أنها تضم مجموعة مترابطة من الأنشطة الكيميائية ، القادرة على الاستجابة المرنة للظروف البيئية . فمثلا .. نجد أن علبة بكتيريا* *Alcaligenes viscolactis* ، تتكون عند درجات الحرارة المنخفضة ، ولا تتكون عند درجات الحرارة المرتفعة ، رغم أن الميكروب ينمو جيداً عند درجات الحرارة المرتفعة . كما يلاحظ تغير فى الاحتياجات الغذائية بين خلايا الميكروبات ، فمثلا .. نجد أن كلا من مستعمرات وخلايا السلالات الدقيقة الحجم "minute" من البكتيريا السبحية Streptococci ، تزداد فى الحجم عندما يتم إمداد المزرعة بكميات قليلة من CO_2 . كما أن *Lactobacillus casei* يمكن تنميته عند رقم ايدروجينى ٥,٠ ، بدون الحاجة لإمداده بفيتامين بريدوكسين Pyridoxine التابع لفيتامين **B** . أما عند رقم ايدروجينى ٧ ، فلابد من اضافة البيريدوكسين للبيئة .

وأغلب التفاعلات التى تؤدى إلى تغير صفة الميكروب غير معروفة تماما ، ولكن من الواضح أنه يمكن أن تعزى إلى تغير فى جزء من النشاط المعقد للخلية .

وهذا التدريب يوضح التغير المؤقت فى الطرز الشكلى ، لتكون الصبغة فى بكتيريا – *Serratia marces cens* ، نتيجة للنمو عند درجات حرارة مختلفة .

---

* *Corynebactrium* **sp ATCC 21698.**

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ قم بإعداد طبقين بترى من بيئة الآجار المغذى ، وباستخدام الطريقة الموضحة فى تدريب ٧ ، خطط الطبقين من مزرعة *Serratia marcescens* .

٢ ــ حضن أحد الطبقين عند ٢٥°م ، أو حرارة الغرفة ، والآخر عند ٣٧°م حتى الدرس العملى التالى .

٣ ــ افحص تأثير الحرارة على تكون الصبغة .

أسئلة QUESTIONS

١ ــ ماهو الحث الإنزيمى enzyme induction ؟ وما هو إعادة التنشيط الإنزيمى enzyme derepression ؟

٢ ــ هل يحدث تغير فى الطرز الشكلى ، دون تغير فى الطرز الجينى فى الكائنات الحية الأرقى ؟

تدريب (٥٢)

الحث الإنزيمى Enzyme Induction

يعتبر تنظيم إنتاج الإنزيمات صورة أخرى من صور تغير البكتيريا ؛ فبعض الإنزيمات أساسية constitutive ، وبالتالى تتكون تحت جميع ظروف النمو ، مثل تلك الظروف الضرورية لتمثيل الجلوكوز . وبعض الإنزيمات مستحثة inducible ، أى أنها تتكون فقط فى وجود مادة التفاعل ، أو تحت ظروف بيئية معينة ، مثل : إنزيم الفوسفاتيز القاعدى alkaline phosphatase ، فهو إنزيم مستحث ، يتكون فقط عندما يتم تجويع الخلية بالنسبة للفوسفات غير العضوية ، ويعمل فقط عند الرقم الأيدروجينى القاعدى .

ويمكن التحكم فى نمو البكتيريا ، بالتحكم فى مادة غذائية غير عضوية مثل الفوسفات . وفى هذه الحالة .. تستجيب الخلايا فسيولوجيا لتركيز الفوسفات غير العضوى فى البيئة ، بأن يتغير إنتاجها لإنزيم الفوسفاتيز القاعدى (تنتجه أو توقف إنتاجه) ، وهو الإنزيم الذى يحلل روابط الإستر فى عدد من مركبات الفوسفات العضوية ، لينتج فوسفات غير عضوى لسد حاجة الخلية . وتوضح مثل هذه التجربة كيف أن أعداد الخلايا ، وتركيز الإنزيم يتغيران بتغير تركيز الفوسفات غير العضوى .

طريقة العمل PROCEDURE

فى الدرس العملى الأول

١ ــ سوف يعطى كل زوج من الطلاب زجاجة من بيئة الكفاف minimal medium . هذه البيئة تحتوى كل الأملاح المعدنية المطلوبة (الأمونيوم ، الكبريتات .. إلخ) لنمو *E. coli* فيما عدا الفوسفات ، وتحتوى البيئة على الجلوكوز كمصدر للطاقة ، والكربون . سوف يعطى لهم أيضا محلول فوسفات معقم يحتوى على ١٠٠ ميكروجرام فوسفات / مل .

٢ ــ قم بإعداد سلسلة من الأنابيب المعقمة كما هو موضح فى جدول (١) .

٣ ــ لقح سلسلة الأنابيب ، بإضافة نقطة لكل أنبوبة من مزرعة نامية على بيئة تحتوى على ٤ ميكروجرام / مل فوسفات . من هذا سوف تتأكد من أن مزارعك سوف تتوقف عن النمو قبل الدرس العملى التالى بوقت قصير (حوالى ٤٨ ساعة) .

فى الدرس العملى التالى

ارفع الأغطية عن الأنابيب (يتم هذا بدون حاجة لظروف التعقيم)

١ ــ رج محتوى الأنابيب جيدا وامسك الأنابيب من الخارج .

٢ ــ قس مستوى النمو فى المزارع بقياس الامتصاص الضوئى ، فى جهاز spectrophotometer عند طول موجه ٦٥٠ nm . استخدم أنبوبة ماء لتضبط صفر الجهاز .

التقدير الكمى لإنزيم الفوسفاتيز القاعدى Assay of Alkaline Phosphatase

يمكن تقدير الفوسفاتيز القاعدى باستخدام عدد من المواد ذات روابط إستر الفوسفات . وتعتبر مادة بارا – نيتروفينيل فوسفات p-nitrophenyl phosphate (PNPP) مادة تفاعل مناسبة . وهذه المادة عديمة اللون ، بينما مادة البارانيتروفينول p-nitrophenol التى تنفرد بعد إزالة مجموعة الفوسفات بالتحلل الإنزيمى ، تعطى لونا أصفرا واضحا . وعلى هذا فإنه باستخدام اسبكتروفوتومتر مع فلتر أزرق (طول موجة ٤٢٥ nm) .. يمكن قياس نشاط المستحضر الإنزيمى بقياس اللون الأصفر الذى يتكون بعد وقت محدد من التحضين .

قم بتقدير نشاط إنزيم الفوسفاتيز القاعدى كما يلى :

١ ــ باستخدام زجاجة قطارة .. ضف نقطة واحدة من التولوين لكل مزرعة (تحذير : التولوين قابل للاشتعال) . حضن لمدة ١٠ ــ ١٥ دقيقة عند درجة ٣٧° م فى حمام مائى . تجرى هذه الخطوة لتحطيم حاجز النفاذية للخلية حتى يمكن للإنزيم ومادة التفاعل أن تتفاعلا بحرية .

٢ ــ دفىء محلول مادة التفاعل (محلول يحتوى على ٢٠ مللجرام / مل : PNPP) حتى درجة

٣٧°م فى حمام مائى . ويجب أن يتم التفاعل عند درجة حرارة ثابتة لأن نشاط الإنزيم يتأثر بالحرارة بشدة .

٣ ــ لأن تحديد الوقت بدقة هام فى هذه الخطوة ، فيجب أن تجرى التجربة فى حمام مائى . ضف ١ر٠ مل من محلول مادة التفاعل إلى كل أنبوبة (انظر جدول ١) بالتتابع ، وعلى فترات متساوية . وبعد ٥ دقائق فقط .. أوقف التفاعل فى كل أنبوبة ، بإضافة ٢ر٠ مل محلول مولر $K_2\ HPO_4$ باستخدام ماصة ٥ مل . ويعتبر هذا التركيز النهائى الناتج من الفوسفات مثبطا قويا لإنزيم الفوسفاتيز القاعدى .

٤ ــ أحدث طردا مركزيا للأنابيب لتُخلص خلايا البكتيريا من المعلق . ومع الحرص على عدم إعادة تحريك الراسب ، قس الامتصاص الضوئى للمحلول الرائق باستخدام جهاز الأسبكتروفومتر عند طول موجة ٤٢٥ nm .

٥ ــ باستخدام أوراق الرسم البيانى الموجودة فى ورقة التقرير .. أعمل ما يلى :

(أ) ارسم رسما بيانيا يوضح العلاقة بين كمية نمو الخلايا ، وبين تركيز الفوسفات غير العضوى فى البيئة .

(ب) ارسم رسما بيانيا للعلاقة بين نشاط إنزيم الفوسفاتيز القاعدى مقسومًا على النمو ، وبين تركيز الفوسفات .

جدول (١) : المحتوى الفوسفاتى للبيئة المستخدمة لتقدير الفوسفاتيز القاعدى .

المحلول	رقم الأنبوبة								
	صفر	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
كمية محلول Na_2HPO_4 (١٠٠ ميكروجرام/ مل) بالملليلتر	٠	٠ر٠٥	٠ر٠٧٥	٠ر١	٠ر١٥	٠ر٢	٠ر٣	٠ر٤	٠ر٦
كمية محلول منظم TRIS الخالى من الفوسفات بالملليلتر	٥	٥	٤ر٩	٤ر٩	٤ر٨٥	٤ر٨٠	٤ر٧	٤ر٦	٤ر٤
تركيز الفوسفات النهائى ميكروجرام / مل	٠	١	١ر٥	٢	٣	٤	٦	٨	١٢

أسئلة QUESTIONS

١ ــ هل *E. coli* تُكوِّن كمية أكبر من الفوسفاتيز القاعدى لكل خلية ، عندما تحتوى كمية قليلة من الفوسفات غير العضوى ، أم عندما تحتوى على كمية كبيرة ؟ كيف يكون ذلك مفيدا للميكروب ؟

٢ ــ هل العلاقة بين المحصول النهائى للنمو الميكروبى ، وبين الفوسفاتيز غير العضوى علاقة خطية ؟ وهل ينبغى أن تكون كذلك ؟ وضح ذلك ؟.

تدريب (٥٣)

التغير فى الطرز الجينى Genotypic Change

الطفرة البكتيرية : عزل طفرة مقاومة للأستربتوميسين

Bacterial Mutation: Isolation of a Streptomycin-Resistant Mutant

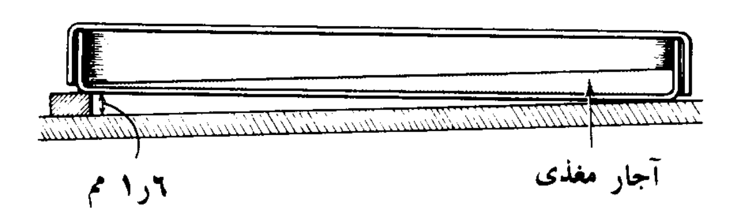
نظرا لقلة معدل تكون الطفرات فى الخلايا البكتيرية ، ونظرا للطرق الخاصة التى يجب استخدامها لانتقاء هذه الطفرات ، فإن التعرف على الطفرة لا يكون دائما عملا سهلا . وقد تؤدى تغيرات معينة فى الظروف الفيزيائية أو الكيميائية للوسط إلى زيادة معدل تكون هذه الطفرات . ومثالاً على ذلك .. تؤدى المعاملة باشعة × ، أو الأشعة فوق البنفسجية (انظر تدريب ٢٨) إلى زيادة معدل الطفور . وإذا كانت الطفرة ، نتيجة للتغير الذى حدث فيها أكثر تواؤمًا مع الظروف البيئية التى تكونت فيها ، فإن نموها سوف يتغلب على نمو المزرعة الأم ، وتصبح هى السائدة .

ويمكن ملاحظة الطفرات التلقائية spontaneous mutants المقاومة للمضادات الحيوية بسهولة ، حيث إنها تنمو فى وجود تركيزات من المضاد الحيوى ، يؤدى عادة إلى تثبيط الميكروبات العادية . وسوف يستخدم فى هذا التدريب طريقة الطبق المتدرج gradient-plate method ، لعزل وانتخاب الطفرات المقاومة للإستربتوميسين .

طريقة العمل PROCEDURE

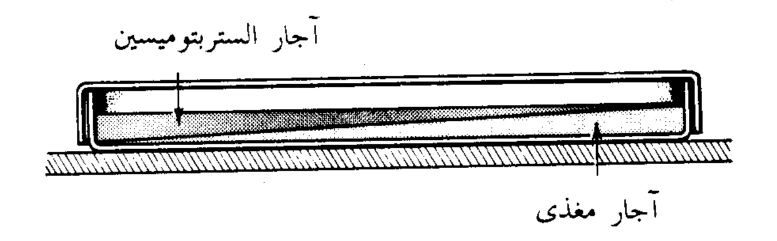
١ ــ قم بإعداد طبق آجار متدرج :

(أ) قم بإمالة طبق بترى معقم بوضع قضيب زجاجى ، أو عصى خشبية قطرها ٦ر١ مم أسفل أحد جوانبه . صب أنبوبة آجار بيئة trypticase soy agar فى الطبق ، واتركه يتصلب فى وضعه المائل بحيث يغطى الآجار كل قاع الطبق .



(ب) بعد تصلب البيئة ، ضع الطبق فى الوضع العادى الأفقى، وضف إلى أنبوبة أخرى

من بيئة trypticase soy agar ١ر٠ مل من محلول إستربتوميسين ، واخلطه مع البيئة جيدا ، ثم صب الآجار على سطح الطبق المتدرج .



٢ ــ ضف بالماصة ٣ر٠ مل من مزرعة *Staphylococcus aureus* على سطح الآجار ، مع الحرص حيث إن الميكروب مسبب للمرض . وباستخدام قضيب زجاجى معقم ، من النوع المستخدم لنشر اللقاح (يعقم بوضعه فى كحول ٩٥٪ ثم الحرق فى اللهب ، ثم تبريده على سطح الآجار المعقم بالطبق) ، قم بنشر المزرعة على سطح الآجار (انظر شكل ٣ – تدريب ١٥) . حضن الطبق عند درجة ٣٧°م حتى الدرس العملى التالى .

٣ ــ افحص نمو مستعمرات مقاومة ، فى المناطق التى تحتوى على نسبة عالية من الإستربتوميسين . بالإبرة المعقمة ذات العقدة .. أعمل معلق فى بويون من المستعمرة النامية فى المنطقة المحتوية على تركيز مرتفع من الإستربتوميسين . ومن هذا المعلق .. لقح بغمسة إبرة أنبوبتى بيئة بويون trypticase soy broth ، محتوية على ٠١ر٠ ، ٠٥ر٠ ملليجرام إستربتوميسين لكل أنبوبة . باستخدام المزرعة الأصلية لميكروب *Staphylococcus aureus* ، لقح أنبوبتى بويون مشابهتين وذلك للمقارنة . حضن الأنابيب عند درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٤ ــ افحص الأنابيب للنمو ، وقارن مع أنابيب المقارنة لمزرعة *S.aureus* . سجل النتائج فى صفحة التقرير .

أسئلة QUESTIONS

١ ــ ما هى الطفرات المعتمدة على الإستربتوميسين Stryptomycin-dependant mutants ؟ كيف يمكنك أن تعدل هذا التدريب للحصول عليها ؟ .

٢ ــ ما هى الطرق التى يمكنك استخدامها لزيادة معدل تكون الطفرات ؟

تخمر اللاكتوز المحكوم بالبلازميد فى بكتيريا إستربتوكوكس لاكتس
Plasmid-Mediated Lactose Fermentation by *Streptococcus lactis*

إن كثيرًا من صفات الميكروبات مثل بعض صور المقاومة للمضادات الحيوية ، تكون المعلومات

الوراثية الخاصة بها موجودة على عناصر من الحامض النووى خارج الكروموسوم ، وتسمى البلازميدات plasmids . وقد يحدث انتقال عال للمادة الوراثية فى البكتيريا من خلال البلازميدات التى يمكنها الانتقال من خلية لأخرى تحت ظروف معينة .

وعندما تفقد الخلايا البكتيرية البلازميد .. فإن الصفات التى تحكمها جينات البلازميد ، يمكن أن تفقد . ويمكن زيادة معدل فقد البلازميدات باستخدام بعض الكيميائيات ، مثل : الاكريفلافين acriflavin ، أو بالتنمية على درجات حرارة مرتفعة . وفى هذا التدريب : يمكنك تشجيع فقد البلازميد من بكتيريا *Streptococcus lactis* ، بزراعة هذه البكتيريا على بيئة تحتوى على الاكريفلافين . ولأن تخمر اللاكتوز محكوم بالبلازميد .. فإن عدم القدرة على تخمر هذا السكر يتخذ دليلاً على فقد البلازميد . وعلى العكس .. فإن القدرة على تخمر الجلوكوز تكون محمولة على الجينات الموجودة على تركيب الحامض النووى الرئيسى (وهو الكروموسوم البكتيرى) وهو لا يتأثر بالاكريفلافين .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ أمامك أنبوبتان من بويون اللاكتوز المحتوى على بروم كريزول بربل ، إحداهما تحتوى على ٦ ميكروجرام / مل أكريفلافين (تحذير : الاكريفلافين عامل مطفر) .

٢ ــ لقح كلتا الأنبوبتين بغمسة إبرة من مزرعة *Streptococcus lactis* strain C_2 .

٣ ــ حضن الأنابيب عند درجة ٣٠° م لمدة ٤٨ ساعة .

٤ ــ افحص الأنـابيب للنمو وتخمر السكر .

اسئلة QUESTIONS

١ ــ كيف يمكنك إثبات أن فقد القدرة على تخمر اللاكتوز لا ترجع إلى حدوث طفرة ؟

٢ ــ ما هى القيمة الاقتصادية لفقد بلازميد اللاكتوز من البكتيريا *S. lactis* ؟

تدريب (٥٤)

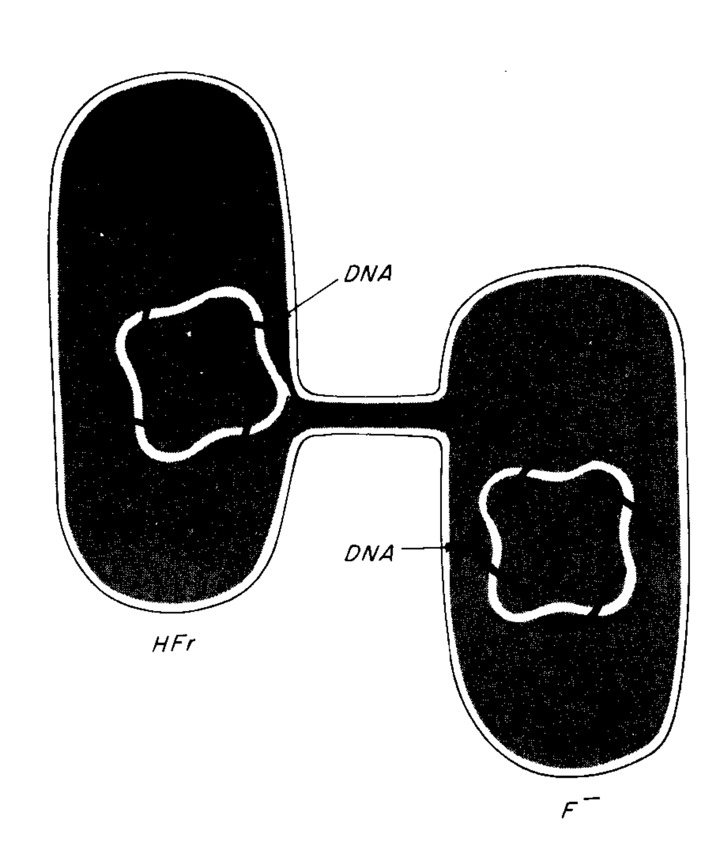
التزاوج البكتيرى Bacterial Conjugation

يعتمد نقل الحامض النووى DNA بواسطة التزاوج ، على حدوث ارتباط أو تلاصق مؤقت بين الخلايا المانحة ، والمستقبلة ؛ لذا أمكن ملاحظة التزاوج فى عدد من الأجناس من مجموعة متقاربة من البكتيريا ، وهى البكتيريا المعوية السالبة لصبغة جرام ومن بينها : *Escherichia, Shigella, Salmonella* ، وأكثر الدراسات التى تمت بالنسبة للتزاوج حدثت فى *E. coli* .

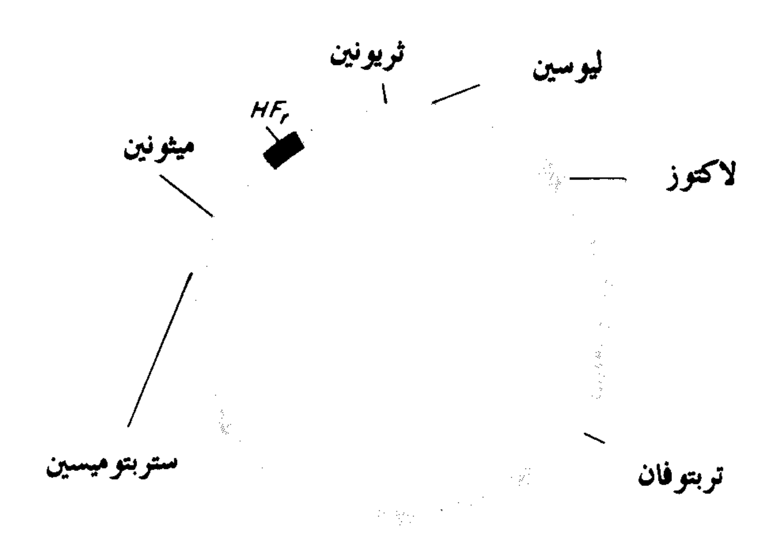
لقد تبين وجود طرازين تزاوجيين two mating types ، فى *E. coli* يتميزان وراثيًا عن بعضهما

بوجود ، أو غياب عنصر مكون من الحامض النووى DNA (بلازميد) بالخلية ، يسمى عامل F (عامل الخصوبة fertility factor) . والخلايا الخالية من عامل F تعمل فقط كمستقبل ، وتسمى F^- ، أو قد تعتبر خلية مؤنثة . أما الخلايا التى تحمل عامل F .. فتعمل كمانح ؛ ولهذا تعتبر خلايا مذكرة . والخلايا المانحة يمكن أن تقسم إلى مجموعتين : مجموعة خلايا F^+ وهى تلك التى يكون فيها العامل F منفصلا عن الكروموسوم البكتيرى ، ومجموعة خلايا Hfr وهى التى يكون فيها العامل F جزءا من الكروموسوم البكتيري . وفى المجموعة الأولى فقط .. فإن عامل الجنس أو العامل F يمكن أن ينتقل بالتزاوج محولا بذلك الخلايا F^- إلى F^+ .

وفى عمليات التزاوج التى تكون فيها خلايا الـ Hfr أحد المتزاوجين .. يتم انتقال الحامض النووى للكروموسوم إلى الخلايا المستقبلة أثناء التزاوج . وكما هو موضح فى (شكل ١) فإن هذا الانتقال يتم بتتابع محدد . ومن النادر أن ينتقل الكروموسوم كله . وفى هذه الحالة فقط .. فإن عامل F ، ينتقل أيضا ، وهذا يؤكد أن العامل F مرتبط فى نهاية الكروموسوم المنتقل . ويوضح (شكل ٢) كروموسومًا من نوع Hfr ، والتتابع الطبيعى لبعض الجينات عليه .



شكل (١) : خلايا فى حالة تزاوج .



شكل (٢) : كروموسوم من نوع Hfr في *E. coli* موضحا عليه مواضع بعض الجينات .

سوف تتابع فى هذا التدريب الاتحاد الوراثى الناتج عن تزاوج سلالتين تمثلان طفرتين من *E. coli* . السلالة C-600 عبارة عن سلالة مستقبلة (F—) تحتاج إلى ثريونين threonine (T^-) وليوسين (L^-) لنموها ، وغير قادرة على تخمير اللاكتوز (Lac—) ، ومقاومة للإستربتوميسين (S^r) . أما السلالة الثانية .. فهى Hfr-235 ، وهى سلالة مانحة لا تحتاج إلى ثريونين (T^+) ، أو ليوسين (L^+) لنموها ، وقادرة على تخمير اللاكتوز (Lac^+) وحساسة للإستربتوميسين (S^s) . ومن المتوقع من التهجين بين هاتين السلالتين .. أن تتم إمكانية الحصول على سلالة ناتجة من الاتحاد الوراثى ، تشابه السلالة البرية لـ wild-type *E. coli* ، والتى سبق أن نتجت عنها الطفرتان المستخدمتان .

طريقة العمل PROCEDURE

أمامك مزارع من *E. coli* ، سلالة C-600 ، وسلالة Hfr-235 نامية على بيئة كاملة غذائيا ، وتم غسلهما تحت ظروف التعقيم عدة مرات باستخدام الطرد المركزى (بهدف التخلص من المواد الغذائية الملتصقة بخلايا البكتيريا) ، ثم تم عمل معلق مركز منهما بنشرهما فى محلول ملحى فسيولوجى بحجم يعادل $\frac{١}{٢٠}$ من الحجم الأصلى للمزرعة .

١ — باستخدام ماصة سعة ١ر١ مل معقمة .. انقل ٠ر١ مل من معلق سلالة C-600 إلى أنبوبة وازرمان معقمة Wasserman tube ، وأيضاً انقل ١ر٠ مل إلى سطح طبق آجار بيئة كفاف محتوية على إستربتوميسين minimal - plus - streptomycin agar plate . قم بنشر الـ ١ر٠ مل من المزرعة على سطح الآجار فى الطبق ، باستخدام قضيب زجاجى منحنى كما يلى :

(أ) اغمس القضيب فى كحول ، ثم مرره بسرعة فى اللهب واسمح للكحول بالاحتراق .

(ب) بعد تبريد القضيب الناشر spreader جيداً بتحريكه حركة دائرية ، استخدمه فى نشر اللقاح على جميع سطح الطبق . كن حذرًا من تجريح الآجار . اكتب على الطبق MA C-600 .

٢ ــ خذ ٢ر٠ مل من معلق السلالة Hfr-235 ، وضف ١ر٠ مل منه إلى أنبوبة وازرمان المحتوية على ١ مل من السلالة C-600 . ثم ضف الـ ١ر٠ مل المتبقية على سطح طبق آخر من بيئة آجار الكفاف المحتوية على إستربتوميسين ، وانشره بواسطة القضيب الناشر كما حدث فى الخطوة رقم ١ . اكتب على هذا الطبق MA-Hfr 235 .

٣ ــ قم بخلط السلالتين بالرج الخفيف ، حيث إن الرج الشديد يؤثر على عملية التزاوج . استخدم ماصة ١ مل معقمة فى التقليب ، وذلك بسحب المخلوط فى الماصة ، ثم تركه ينساب ثانية فى الأنبوبة . ثم اترك هذا المخلوط للسلالتين على منضدة المعمل بدون حركة لمدة ٣٠ ــ ٦٠ دقيقة . بعد ذلك اسحب بالماصة المعقمة بعضا من هذا المخلوط ، وضف ١ر٠ مل منه على طبق ثالث من أطباق بيئة آجار الكفاف المحتوى على إستربتوميسين ، وقم بنشره على سطح الطبق كما فى خطوة رقم ١ . اكتب على هذا الطبق MA C-600 plus Hfr- 235 .

٤ ــ حضن الأطباق مقلوبة على درجة ٣٧° م ، واختبرها فى الدرس العملى التالى لنمو مستعمرات منعزلة .

باستخدام أطباق المقارنة من بيئة آجار الكفاف .. فإنه يمكنك أن تلاحظ الفرق بين المزارع من حيث الاتحادات الوراثية ، وذلك من وجود أو عدم وجود علامات دالة markers مختلفة ، مثل : التغير فى الاحتياج إلى الثريونين ، والليوسين ، وفى المقاومة ، والحساسية للإستربتوميسين . كما تستخدم بيئة EMB التفريقية ، لملاحظة التغير فى تخمر اللاكتوز كعلامة للاتحاد الوراثى ، حيث تظهر المستعمرات المخمرة للاكتوز على بيئة EMB كمستعمرات غامقة اللون ، بينما تلك غير المخمرة للاكتوز تظهر غير ملونه ، أو وردية .

أسئلة QUESTIONS

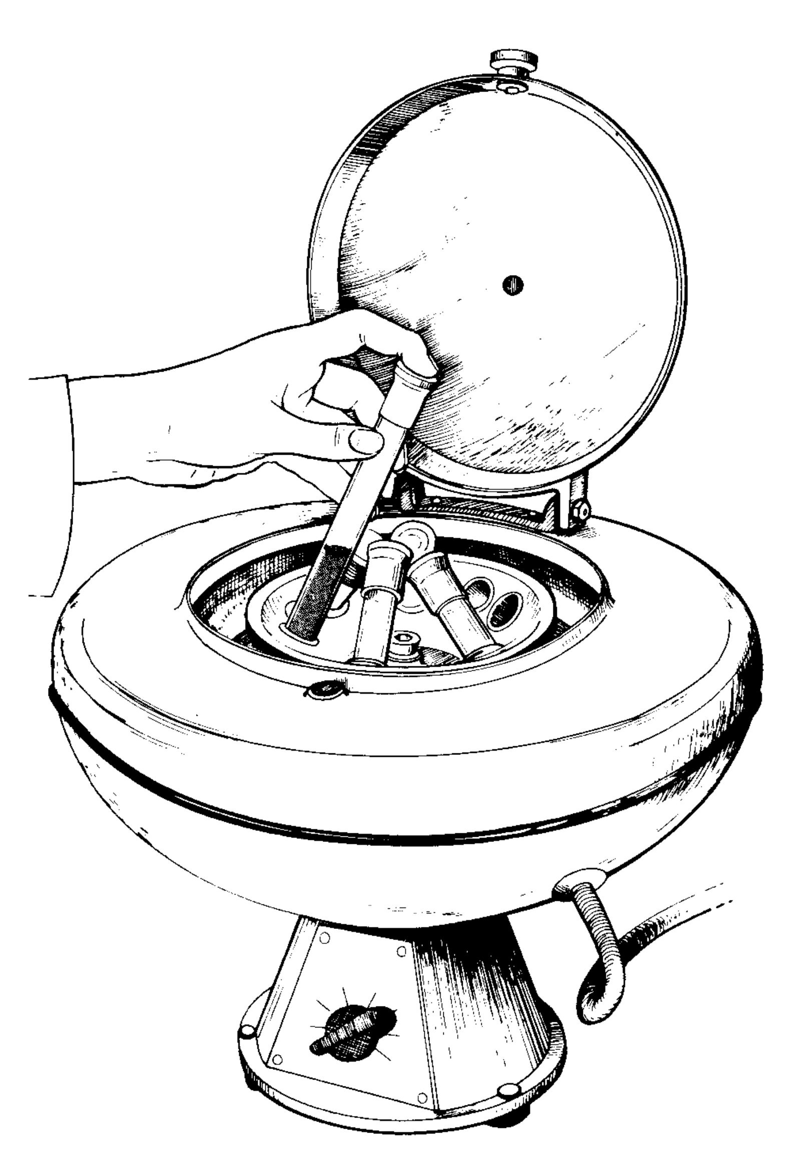
١ ــ ما هو الإبيسوم episome ؟

٢ ــ كيف يمكنك التأكد من أن السلالة C-600 لا يمكنها تمثيل الليوسين ؟ وأن السلالة Hfr-235 حساسة للإستربتوميسين ؟

تدريب (٥٥)

التحول الوراثى فى البكتيريا Bacterial Transformation

التحول الوراثى نوع من الاتحادات الوراثية ، يتم فيها دخول حامض نووى DNA حر من خلية مانحة فى خلية مستقبلة واتحاده مع الجينوم الخاص بها . وخلايا السلالة المستقبلة القادرة على ربط الحامض النووى الحر مع الجينوم الخاص بها ، يطلق عليها اسم خلايا قادرة على الاتحاد الوراثى competent . ولوحظت ظاهرة القدرة على الاتحاد الوراثى (competence) ، فى بعض سلالات لأجناس قليلة من البكتيريا ، التى توجد فى مرحلة محددة من مراحل النمو على بيئة الكفاف . (يلاحظ أن المزرعة البكتيرية العادية تحتوى على مخلوط عشوائى من البكتيريا فى أعمار مختلفة) .



شكل (١) : وضع الأنابيب فى جهاز الطرد المركزى .

وسوف تقوم فى هذا التدريب باستخلاص الحامض النووى DNA من سلالة من *Bacillus subtilis* تحتاج إلى تربتوفان ، ولكنها قادرة على تمثيل احتياجاتها من الهستيدين . هذا الحامض النووى المستخلص الحر ، سوف تستخدمه فى عمل التحول الوراثى فى سلالة من *Bacillus subtilis* ، ذات احتياجات غذائية خارجية (احتياجات غذائية تضاف للبيئة) **auxotrophic** بالنسبة للهستيدين (حيث أنها غير قادرة على تمثيل الهستيدين) ، وذلك بتحويلها إلى سلالة قادرة على تمثيل الهستيدين .

طريقة العمل PROCEDURE

استخلاص الحامض النووى DNA

١ ــ اجر عملية طرد مركزى لمزرعة السلالة *Bacillus subtilis* ، التى تحتاج التربتو (سلالة ١٦٨) (انظر شكل ١) .

٢ ــ تحت ظروف التعقيم .. تخلص من السائل الرائق ، واعد نشر الخلايا الراسبة فى ٥ مل من محلول ملحى مع سترات . وتحت ظروف التعقيم .. ضع المخلوط فى أنبوبة اختبار سعة ٢٥×١٥٠ مم .

٣ ــ ضف ٥ر٠ مل محلول إنزيم ليسوزيم lysozyme solution (محلول ٢ ملليجرام / مل) إلى الأنبوبة واخلط جيدا .

٤ ــ رج المخلوط لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة الغرفة ، مع ملاحظة اختفاء عكارة المخلوط (تحلل الخلايا) . وإذا لم يتم التحلل بدرجة معقولة ، ضف ٢٥ر٠ مل أخرى من إنزيم الليسوزيم ، ورج لمدة ١٥ دقيقة أخرى على درجة حرارة الغرفة (انظر شكل ٢) .

٥ ــ إذا حدث التحلل بدرجة شبه كاملة .. ضف ٥ مل من محلول ٤ مولر NaCl للأنبوبة واخلط جيدا ، ورشح المخلوط خلال مرشح غشائى (ذو ثقوب سعة ٠,٤٥ ميكرومتر) ، مع جمع الراشح فى أنبوبة اختبار معقمة . اختبر ١ر٠ مل من الراشح الذى يحتوى على الحامض النووى DNA المستخلص لمدى احتفاظة بحالته المعقمة ، وذلك بتخطيط جزء منه على طبق بيئة آجار الدم المحتوى على تربتوز tryptose- blood agar . اكتب البيانات على الأنبوبة ، واحفظها فى الثلاجة حتى الدرس العملى التالى ، ثم حضن الطبق على درجة ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى .

إجراء التحول الوراثى

١ ــ لإعداد خلايا قادرة على الاتحاد الوراثى competent .. لقح ١ مل من معلق مغسول لمزرعة عمرها ٥ ساعات من *Bacillus subtilis* ، تحتاج إلى تربتوفان وهستيدين (his^{-}, trp^{-}) ، فى

دورق يحتوى على ٩ مل بيئة تحول وراثى معقمة (وهى بيئة كفاف تحتوى على تربتوفان وهستيدين) .

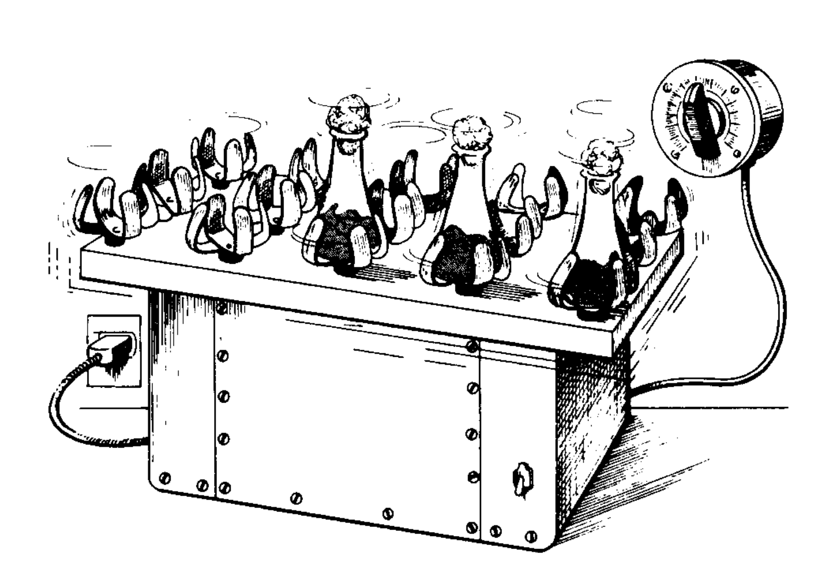
٢ ـــ اعمل تهوية للدورق بالرج لمدة ساعة (انظر شكل ٣) .



خلايا قبل معاملتها بالليسوزيم

خلايا معاملة بالليسوزيم

شكل (٢) : تحليل الخلايا بالليسوزيم .



شكل (٣) : تحضين المزارع على جهاز رج دوّار .

٣ ــ ضف بالماصة ٩ر٠ مل من هذه الخلايا القادرة على الاتحاد ، كل فى ثلاث أنابيب اختبار معقمة .

٤ ــ اكتب أ ، ب ، جـ على الأنابيب . ضف للأنبوبتين أ ، ب ١ر٠ مل من مستخلص الحامض النووى DNA المعقم المجهز من فترة العمل السابقة . وفى نفس الوقت ضف للأنبوبة ب ١,٠ مل من محلول الإنزيم المحلل للحامض النووى ، DNase (محلول ٢ ملليجرام / مل) . أما الأنبوبة جـ .. فيضاف إليها ١ر٠ مل من محلول ملحى مع سترات معقم ، وتستعمل كمقارنة (خالية من الحامض النووى DNA) .

٥ ــ قم بتهوية كل الأنابيب بالرج لمدة ساعة .

٦ ــ اكتب على ثلاث أطباق من بيئة آجار الكفاف المحتوية على تربتوفان ، أ،ب،جـ، ثم انقل ١ر٠ مل من كل من الأنابيب أ،ب،جـ الى الأطباق أ،ب،جـ على التوالى . وباستخدام قضيب زجاجى منحنٍ .. انشر المعلق على سطح الأطباق . وفى نفس الوقت أعمل تخفيفات ١٠—١ ، ١٠—٢ من محتوى الأنبوبة أ، ثم أنقل ١ر٠ مل من كل تخفيف إلى أطباق من بيئة آجار الكفاف المحتويه على تربتوفان ، واكتب على الأطباق : أ ١٠—٢ ، أ ١٠—٣ على التوالى . وباستخدام قضيب زجاجى منحنٍ .. أيضا أنشر هذه العينات على سطح الآجار .

٧ ــ حضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ــ ٤٨ ساعة . وقم بعد المستعمرات التى أظهرت تحولا فى كل تخفيف .

أسئلة QUESTIONS

١ ــ لماذا تضيف محلولاً ملحيًا محتويًا على سترات ، للسلالة المانحة ، قبل عملية تحليل الخلايا ؟

٢ ــ هل تعتقد أن التحول الوراثى يحدث فى الطبيعة ؟

الباب الحادى عشر

الفيروسات

THE VIRUSES

الفيروسات جسيمات حية دقيقة ، خارج نطاق الرؤية للميكروسكوب الضوئى ultramicroscopic ، ولا يمكن مشاهدتها إلا باستخدام القدرة التوضيحية العالية للميكروسكوب الإلكترونى . وهى حبيبات ، لا خلوية ، يمكن اعتبارها بدرجة ، أو بأخرى جزيئات كبيرة macromolecules ، مكونة أساسا من جينوم من حامض نووى إما DNA ، أو RNA مع بروتين . وهى متطفلة حتما ، حيث يستطيع الجينوم الخاص بها المكون من حامض نووى ، التحكم واستخدام القدرات التمثيلية لخلايا العائل لصالح تكاثر الفيروس .

وحبيبة الفيروس ، أو الفيريون virion ، تتكون أساسا من مركز من الحامض النووى محاط بغطاء بروتينى pratein يسمى كابسيد capsid (انظر شكل (١) فى التدريب (٥٨)) . وهذا الغطاء يتكون من تحت وحدات بروتينية pratein تسمى كبسوميرات capsomers . وفى بعض الفيروسات الأكثر تعقيداً .. نجد أن الكابسيد النووى nucleocapssid (وهو المركز النووى مع الغطاء البروتينى) يحاط بغلاف envelope إضافى ، والبعض الآخر له زوائد ، أو نتوءات سطحية spikelike surface appendages .

ومن الناحية المورفولوجية .. يمكن تقسيم الفيروسات إلى ثلاث مجاميع : فيريونات عصوية الشكل ، فيريونات مكعبة cubic أو متعددة الأوجه polyhedral ، وتلك التى لها تركيب أكثر تعقيدا .

وفى بداية تطوّر علم الميكروبيولوجى ، لم يمكن ملاحظة أو مشاهدة الفيروسات ، إلا من خلال أنها عوامل مسببة للمرض ، لوحظ وجودها من خلال أعراض الأمراض التى تسببها . وحتى يومنا هذا ، الذى أمكننا فيه مشاهدة الفيروسات بالميكروسكوب الألكترونى ، لازلنا نعتمد فى دراستها على الأعراض الناتجة تجريبيا من فيروسات مسببة للمرض . وعلى هذا .. فإنه لدراسة فيروس البكتيريا ، أو البكتريوفاج Bacteriophage (الفيروسات المحدثة للموض للبكتيريا) فإننا نلاحظ إصابة مزرعة معملية . أما فى حالة فيروسات النبات فنلاحظها بالمرض على نبات تجريبى . ولدراسة فيروسات الحيوان تستعمل مزارع للفيروس على جنين بيض الدجاج ckick-embryo culture ، أو على مزارع الأنسجة tissue culture بدلاً من إصابة الحيوان . وتهدف التدريبات الموجودة فى هذا الباب ،

إلى تعريفك ببعض الطرق المستخدمة لزراعة الفيروسات ، ومعرفة بعض صفات الفيروسات ، وطرق تكاثرها ، وعدها بعد المناطق الخالية من النمو البكتيرى plaques وباختبار تجمع الهيم hemagglutination .

تدريب (٥٦)

عزل وصفات البكتيريوفاج Bacteriophage Isolation and Characteristics

من الممكن عزل فيروسات البكتيريا التى تسمى عادة (البكتريوفاج) ، من عدد من الأوساط الطبيعية ، وهي لا تستطيع أن تعيش منفردة ؛ لذلك فإنها توجد حيث توجد الخلايا العائلة . فإذا ماكنت مهتماً بعزل فاج مسبب للمرض لبكتيريا الأمعاء الغليظة ، فإن مياه المجارى تعتبر المكان المنطقى للعزل . وبالمثل .. فإن التربة تعتبر مصدراً مناسبًا للفاج الخاص بالبكتيريا المتجرثمة ، وغيرها من البكتيريا التى تعيش فى التربة .

وتحت الظروف الطبيعية .. فإن أعداد الفاج فى المصادر الطبيعية لاتكون كبيرة ؛ ولهذا فإن الخطوة الأولى للحصول على الفاج هى خطوة الإكثار Enrichment ، والتى يتم فيها تحضين مصدر الفاج مع مزرعة من خلايا العائل لتزداد أعداد الفاج (انظر شكل ١) . ومع نمو خلايا البكتيريا تتكون حبيبات الفيروس ، ثم يلى ذلك انفجار الخلايا وانطلاق الفيروسات فى البيئة . وبعد عملية الإكثار هذه .. تتم عملية طرد مركزى للعينة المحتوية على أعداد كبيرة من الفاج للتخلص من المواد الكبيرة الحجم ، ثم يتم إمرارها خلال مرشح بكتيرى للتخلص من البكتيريا الملوثة . ولابد أن يحتوى السائل الراشح الناتج على الفاج . ويمكنك التأكد من ذلك بخلط جزء من السائل مع مزرعة حديثة من خلايا البكتيريا العائلة السليمة ، ثم زراعة المخلوط على سطح طبق بيئة آجار . وبعد التحضين .. فإن غشاء النمو البكتيرى — على سطح الطبق — سوف تتخلله مناطق شفافة خالية من النمو تسمى plaques (انظر شكل ٢) . وتمثل هذه المناطق الشفافة مناطق تكاثر الفاج ، وبالتالى تحلل خلايا البكتيريا فى المنطقة وموتها .

وفى هذا التدريب سوف تحاول عزل فيروس بكتيرى من *Escherichia coli* نظرا لأن هذا الفاج واسع الانتشار نسبيا .

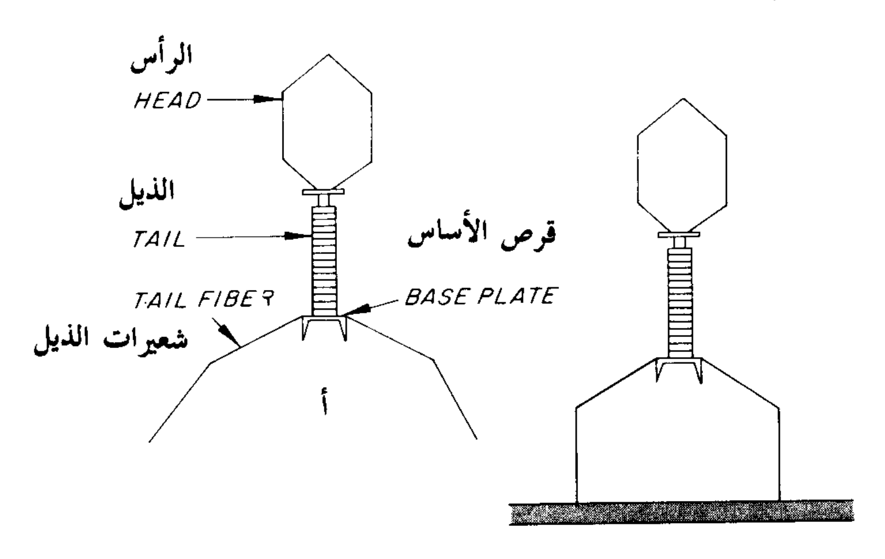
طريقة العمل PROCEDURE

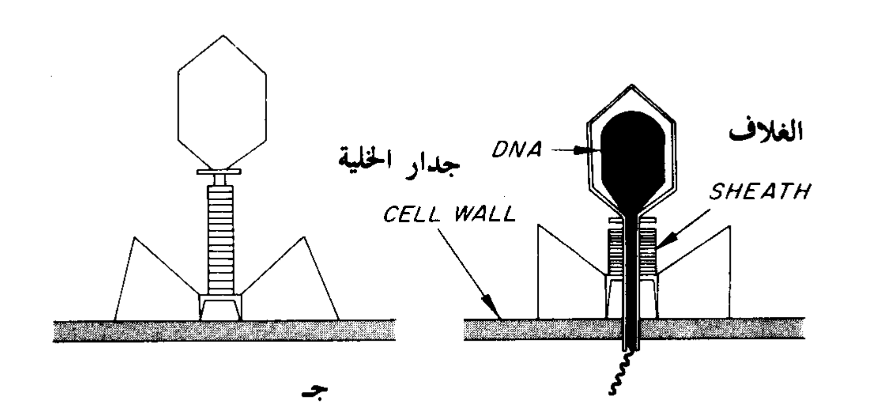
يجب أن يعمل كل زوج من الطلاب مع بعضهما .

١ — ضف ٤٥ مل من مياه المجارى إلى ٥ مل من البويون المركز الذى أمامك (ملحوظة : تتواجد مكونات هذا البويون المركز deca strength broth — بتركيز يعادل عشرة أضعاف

التركيز العادى الذى سوف نحصل عليه بعد التخفيف بمياه المجارى ، وذلك لتوفير المستوى المناسب من المواد المغذية) .

٢ ــ لقح المخلوط بواسطة ٥ مل من مزرعة *E. coli* عمرها ٢٤ ساعة ، ثم حضن لمده ٢٤ ساعة على ٣٧° م . وهذه الخطوة أساسا عبارة عن عملية إكثار بهدف زيادة عدد الفاج .





شكل (١) : اتصال الفاج بالعائل (عن L. Simon and T,Anderson, Virolosy 32:295, 1967) .

(أ) فاج حر .

(ب) شعيرات الفاج تلتصق بجدار خلية العائل .

(جـ) ذيل الفاج يلتصق بجدار خلية العائل .

(د) ينكمش غلاف ذيل الفاج ويتم حقن الـ DNA خلال جدار الخلية إلى السطح الخارجى للغشاء الخلوى للعائل .

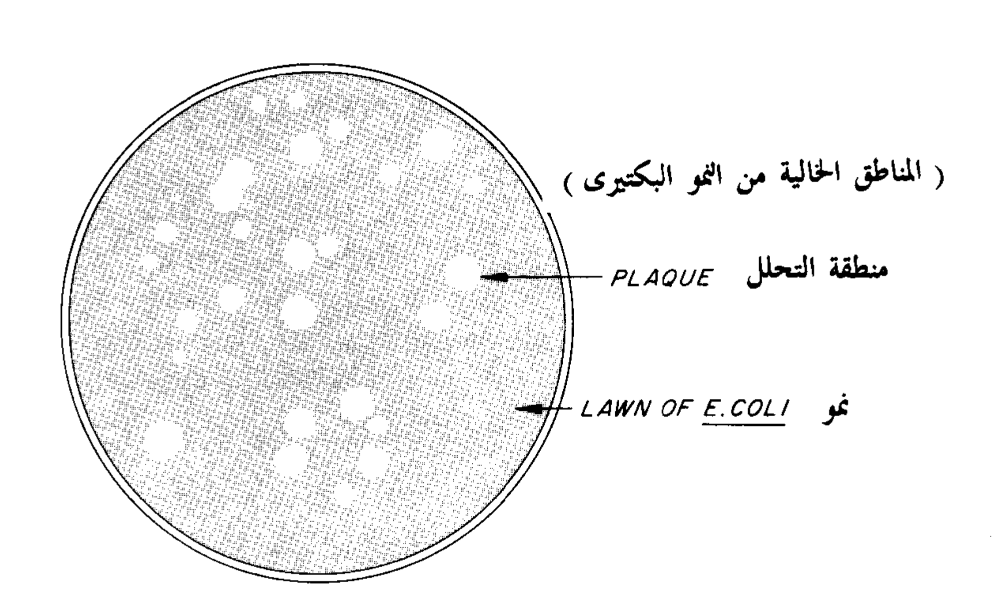
٣ ــ قم بطرد مركزى لـ ١٠ مل من مزرعة المجارى ، وذلك على سرعة ٢٥٠٠ لفة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق .

٤ ــ قم بإمرار السائل الرائق الناتج من الطرد المركزى خلال مرشح بكتيرلوجى (هذه الخطوة يتم فيها التخلص من البكتيريا التى من الممكن أن تنمو على الطبق فى أثناء الخطوات التالية) ، ويمكنك عندئذ اختبار السائل الرائق الناتج لوجود الفاج .

٥ ــ قم بإسالة ثلاث أنابيب من آجار مغذى عادى ، وثلاث أنابيب من آجار مغذى طرى soft (يحتوى على ٧ر٠٪ آجار فقط) . برد الآجار حتى ٤٥°م ، ثم صب كل أنبوبة من الآجار المغذى العادى فى طبق بترى واترك الأطباق الثلاثة لتتصلب .

٦ ــ بعد تبريد أنابيب الآجار المغذى الطرى (٣ مل بكل أنبوبة) إلى ٤٥°م، ضف ١ر٠ مل من مزرعة *E. coli* عمرها ٢٤ ساعة (نفس السلالة المستخدمة فى خطوة رقم ٢) لكل أنبوبة .

٧ ــ للأنبوبة الأولى من أنابيب الآجار الطرى الملقحة ، ضف نقطة واحدة من مترشح مزرعة المجارى (من الخطوة رقم ٤) ، اخلط ، ثم صب المخلوط على سطح أحد أطباق الآجار المغذى التى سبق إعدادها فى الخطوة رقم ٥ . ضف ٥ نقاط من الراشح الناتج من الخطوة رقم ٤ إلى أنبوبة أخرى ثم اخلطه وصبه على سطح طبق ثان من أطباق الخطوه رقم ٥ . وكمقارنة .. صب الأنبوبة الثالثة من الآجار الطرى الملقح فى الطبق الثالث . اترك الأطباق للتصلب ثم حضنها مقلوبة على درجة ٣٧°م حتى تلاحظ المناطق الشفافة الخالية من النمو البكتيرى (مناطق التحلل) plaques (٦ ــ ٢٤ ساعة) .



شكل (٢) : مناطق التحلل plaques فى غشاء نمو *E. coli*

٨ ــ اختبر الأطباق المعاملة بمزرعة المجارى لمناطق التحلل plaques (مناطق شفافة مستديرة) . هذه المناطق الشفافة تمثل مناطق هاجمت فيها حبيبات الفاج خلايا المزرعة الحديثة لـ *E. coli* وسببت تحللها .

٩ ــ اعزل مزرعة نقية من الفاج ، وذلك بقطه منطقة تحلل plaque واحدة ، بإبره تلقيح ذات العقدة معقمة ، ونقلها إلى مزرعة حديثة من العائل *E. coli* .

١٠ ــ حضن مزرعة *E. coli* الملقحة بالفاج ، ومزرعة أخرى غير ملقحة كمقارنة على درجة ٣٧° م ، مع الرج الخفيف لمده ٣ ساعات .

ولاحظ ظهور الشفافية (التحلل) فى المزرعة الملقحة .

والبكتيريوفاج مثل غيره من الفيروسات ، شديد التخصص بالنسبة للعائل . وعلى هذا .. فإن الفاج البكتيرى الذى عزلته فى هذا التدريب ، متخصص لسلالة *E. coli* التى استخدمتها فى خطوة الإكثار رقم ٢ (أو السلالات الشديدة القرابة لها) .

ويمكنك التأكد من ذلك بعدوى مزارع حديثة عديدة من *E. coli* (والتى سوف يمدك بها مشرف الدرس العملى) بالفاج الذى عزلته .

أسئلة QUESTIONS

١ ــ لماذا لا يستمر انتشار منطقة التحلل plaque ، بحيث يغطى كل الطبق ويصبح كله شفافا ؟

٢ ــ لماذا يجب أن تتم معاملة كل الأدوات الزجاجية ، والبيئات ، والأدوات بالتجارب ، أو بالأوتوكلاف بعد استخدامها فى هذا الاختبار ؟

٣ ــ كيف يمكنك عد (titer) الفاج فى المحلول الأصلى ؟

٤ ــ هل يمكنك استخدام طريقة العمل المستخدمة فى هذه التجربة ، للتأكد من وجود الفاج المعتدل (الهادئ) Temperate phage ؟

تدريب (٥٧)

إنتاج البكتيريوفاج : النمو ذو المرحلة الواحدة

Bacteriophage Production: Single-Step Growth

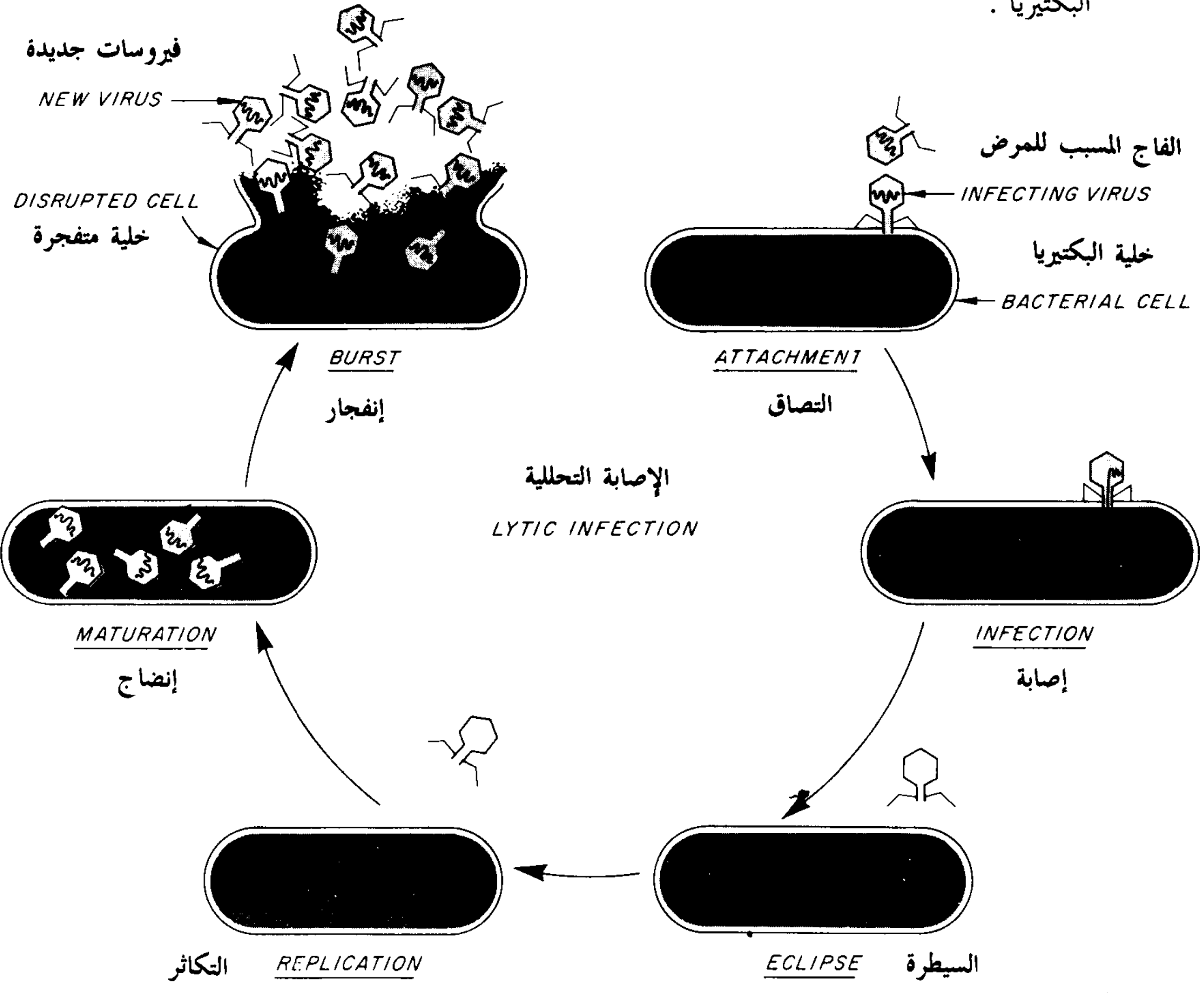
تبدأ دورة التكاثر للفاج بادمصاصه adsorption على سطح خلايا العائل الحساس . يشبه الفاج فى شكله أبا ذنيبة Tadpole shape أى له رأس وذيل .

يلتصق الفاج بجدار الخلية العائلة بادئا بالذيل ، ثم يعمل الذيل كما لو كان إبرة محقن حيث يخترق

الجدار بالاستعانة بالإنزيمات ، ويحقن الحامض النووى المكون لمركز الفاج داخل خلية العائل (انظر شكل ١) .

وبمجرد دخوله داخل الخلية .. يفقد الحامض النووى أى تشابه بينه وبين الفاج الكامل ، ويطلق عليه عندئذ اسم الفاج الخضرى vegetative phage . ثم يقوم هذا الفاج بالتحكم فى القدرة التمثيلية لخلية العائل ، ويتكاثر بسرعة ليتضاعف مئة مرة أو أكثر .

يلى ذلك تمثيل البروتين اللازم لتغطية كل وحدة من الفاج ، ويؤدى ذلك إلى اكتمال تكون نسل حبيبات الفاج . بعد ذلك تتحلل خلية العائل ، وتنفرد منها مئات من حبيبات الفاج المتماثلة . ويطلق على هذه الدورة اسم الدورة التحللية lytic cycle ، أو الدورة التكاثرية reproductive cycle لفيروس البكتيريا .



شكل (١) : الدورة التحللية .

ويطلق على الفترة ، التى تمر بين ادمصاص الفاج على خلية العائل حتى انفراد نسل الفاج ، فترة الكمون (الحضانة) Latent peroid . أما عدد حبيبات الفاج التى تتحرر فى نهاية هذه الفترة ، فتسمى حجم الانفجار burst size . وعلى عكس تكاثر البكتيريا .. فإن تكاثر فيروسات البكتيريا يظهر كما لو كان عملية ذات مرحلة واحدة one-step procedure ، حيث لا تنطلق أى أعداد من الفاج إلا عند نهاية فترة الكمون ، فعندما تتحلل الخلية يحدث ارتقاع مفاجئ لعدد حبيبات الفاج .

فى هذه التجربة .. ستتابع تكاثر الفاج باستخدام طريقة النمو ذات المرحلة الواحدة . فى هذه الطريقة .. سيخلط معلق بكتيريا حساسة للفاج مع معلق للفاج المناسب ، ثم يحضن المخلوط حتى يتم ادمصاص الفاج . يتم بعدئذ تخفيف المخلوط لمنع حدوث ادمصاص بعد ذلك . تؤخذ عينات على فترات ، ويتم استخدامها فى عد الفاج ، وذلك بعد مناطق تحلل نمو البكتيريا ؛ أى المناطق الخالية من النمو plaques . ومن المعلومات الناتجة ، وبمعرفة عدد البكتيريا الأصلى ومعدل التخفيف ، يمكنك حساب عدد حبيبات الفاج الناتج عن كل خلية فى كل فترة . يعمل منحنى بيانى يربط العلاقة بين عدد الفاج مع الوقت ، وهذا سيعبر عن النمو ذو المرحلة الواحدة للفاج نتيجة للعدوى . ويمكن من هذا المنحنى حساب فترة الكمون ومتوسط حجم الأنفجار للإصابة الفيروسية .

طريقة العمل PROCEDURE

يعمل الطلاب فى مجموعات من طالبين ، أو أكثر .

١ ــ صب ثلاثة أطباق من مزرعة *Escherichia coli,* Strain B بتخفيفات ١٠^-٥ ، ١٠^-٦ ، ١٠^-٧ .

٢ ــ ضع ٩ر٠ مل من مزرعة *E. coli* فى أنبوبة اختبار معقمة .

٣ ــ ضع ١ر٠ مل من معلق بكتريوفاج T2 على الأنبوبة التى بها ٩ر مل *E. coli* ، واترك المخلوط لمدة ٥ دقائق ، حيث يتم فى هذه المدة ادمصاص حبيبات الفيروس على حوالى ٨٠٪ من خلايا البكتيريا (ملحوظة : تحديد الوقت بدقة فى هذه الخطوة والخطوات التالية له أهمية قصوى) .

٤ ــ انقل مخلوط الفاج والـ *E. coli* فى أنبوبة جهاز طرد مركزى معقمة ، وذلك تحت شروط التعقيم . تخلص من السائل الرائق بعد الطرد المركزى ، ثم اعد نشر راسب الخلايا من ٩ر٠ مل بويون مغذى وأخلط جيدا . هذه الخطوة تساعد على التخلص من حبيبات الفاج التى لم يتم ادمصاصها .

٥ ــ ضف ١ر٠ مل من معلق الخلايا الناتج عن الخطوة ٤ إلى ٩ر٩ مل بويون مغذى ، ثم اخلط جيداً (ما هو معامل تخفيف المزرعة الأصلية عندئذ ؟) .

٦ ــ ضف ٠,١ مل من معلق الخلايا المخفف الناتج من الخطوة ٥ إلى ٩,٩ مل من بويون مغذى ، ثم اخلط جيدا ، وحضن على درجة ٣٧° م فى حمام مائى .

٧ ــ سخن ٥ أنابيب بيئة آجار مغذى عادى ، و ٥ أنابيب من آجار مغذى طرى (٠,٧٪ آجار) . برد الآجار حتى ٤٥ ــ ٥٠° م ، ثم صب أنابيب الآجار المغذى العادى فى أطباق واتركه ليتصلب .

٨ ــ برد أنابيب الآجار المغذى الطرى إلى ٤٥° م ، ثم ضف ٣ ، أو ٤ نقط من مزرعة *E. coli* strain B الأصلية لكل أنبوبة . ومع اعتبار الخطوة رقم ٣ هى وقت البداية .. ضف ١ر٠ مل من المزرعة المخففة من خطوة رقم ٦ إلى أنبوبة من أنابيب الآجار الطرى الملقحة ، وذلك على فترات بعد ٢٠، ٣٠، ٣٥، ٤٠ دقيقة . اخلط كل أنبوبة وصبها على سطح أحد أطباق الآجار المغذى العادى الذى سبق إعدادة فى الخطوة رقم ٧ . اترك الآجار الطرى ليتصلب ، ثم حضن الأطباق (مقلوبة) على درجة ٣٧° م حتى الدرس العملى التالى .

٩ ــ قدر أعداد *E. coli* من الأطباق التى أعدت فى الخطوة رقم ١ . اختبر الأطباق الناتجة من الخطوة رقم ٨ ، وقم بِعَدّ المناطق الخالية من النمو البكتيرى plaques عند الفترات المختلفة .

تدريب (٥٨)

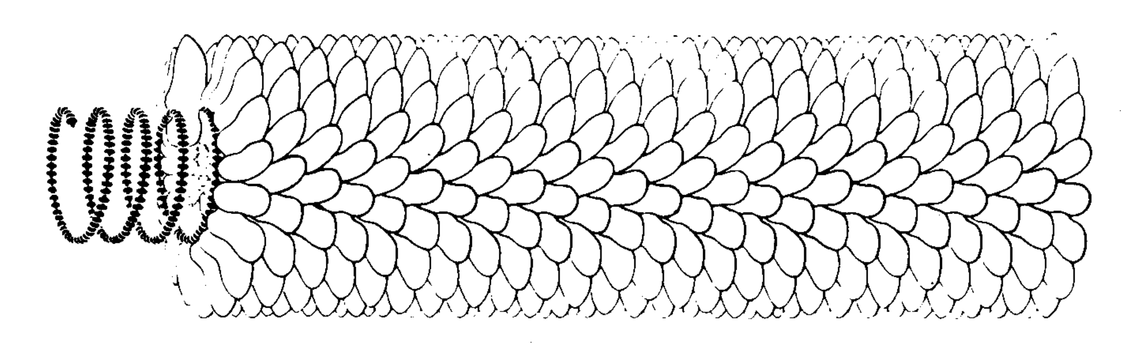
فيروس موزايك الدخان (الطباق) Tobacco Mosaic Virus:

عزله ، وعدوى النباتات Isolation and Infection of Plants

يعتبر فيروس موزايك الدخان (فيروس TMV) ، أول الفيروسات التى اكتشفت فى تاريخ علم الفيروسات Virology ، وأول الفيروسات التى أمكن تنقيتها ، وأول الفيروسات التى أمكن الحصول عليها فى صورة متبلورة . وهذا الفيروس العصوى ، أو الحلزونى الذى يوضحه (شكل ١) ، يصيب عائله ، وهو نبات الدخان ، عن طريق جرح أو أى إصابة ميكانيكية . والإصابة بفيروس موزايك الدخان تظهر بصور مختلفة تعتمد على سلالة النبات ، فقد تظهر كإصابة جهازية systemic infection تؤدى إلى تجعد wrinkling وتغضن shriveling لكل أوراق النبات ، أو قد تظهر بإصابات موضعية localized infections على الأوراق المصابة فقط فى شكل بقع ميتة necrotic lesions صغيرة بنية اللون . وتحتاج أعراض الإصابة الجهازية إلى ١ ــ ٣ أسابيع لتظهر على النبات ، بينما الإصابة الموضعية تظهر فى خلال ٢ ــ ٤ أيام من العدوى .

وفى هذه التجربة سوف تقوم أولاً بعزل فيروس موزايك الدخان من نبات دخان مصاب ، وذلك بطحن الأوراق المصابة ثم ترشيح المستخلص . يستخدم المترشح بعد ذلك فى إعادة عدوى

سلالتين من نبات الدخان ، هما : السلالة NN والسلالة التركية Turkish . ولأن النباتات التى سوف تُعدَى هى نباتات سليمة ، فلابد من جرح خلايا ورقة النبات باستخدام مسحوق صنفرة الكربوراندم abrasive carborandum قبل تلقيح النبات بالفيروس (انظر شكل ٢)



شكل (١) : نموذج لفيروس موزايك الدخان يوضح السلسلة الحلزونية للحامض النووى RNA الداخلى والغطاء البروتينى الخارجى capsid المكون من وحدات Capsomeres .

From The Gentic Code of a Virus. by H.Fraenkel-Conrat, Scientific American, October 1964. Copyright © 1964 by Scientific American. Inc.

طريقة العمل PROCEDURE

يعمل الطلاب فى مجموعات من ٥ ، أو ٦ طلاب .

ملحوظة : اغسل اليدين جيداً بالماء والصابون ، قبل وبعد تلقيح النباتات السليمة ، وذلك حتى لا تتسبب فى نقل الإصابة الفيروسية إلى مكان آخر .

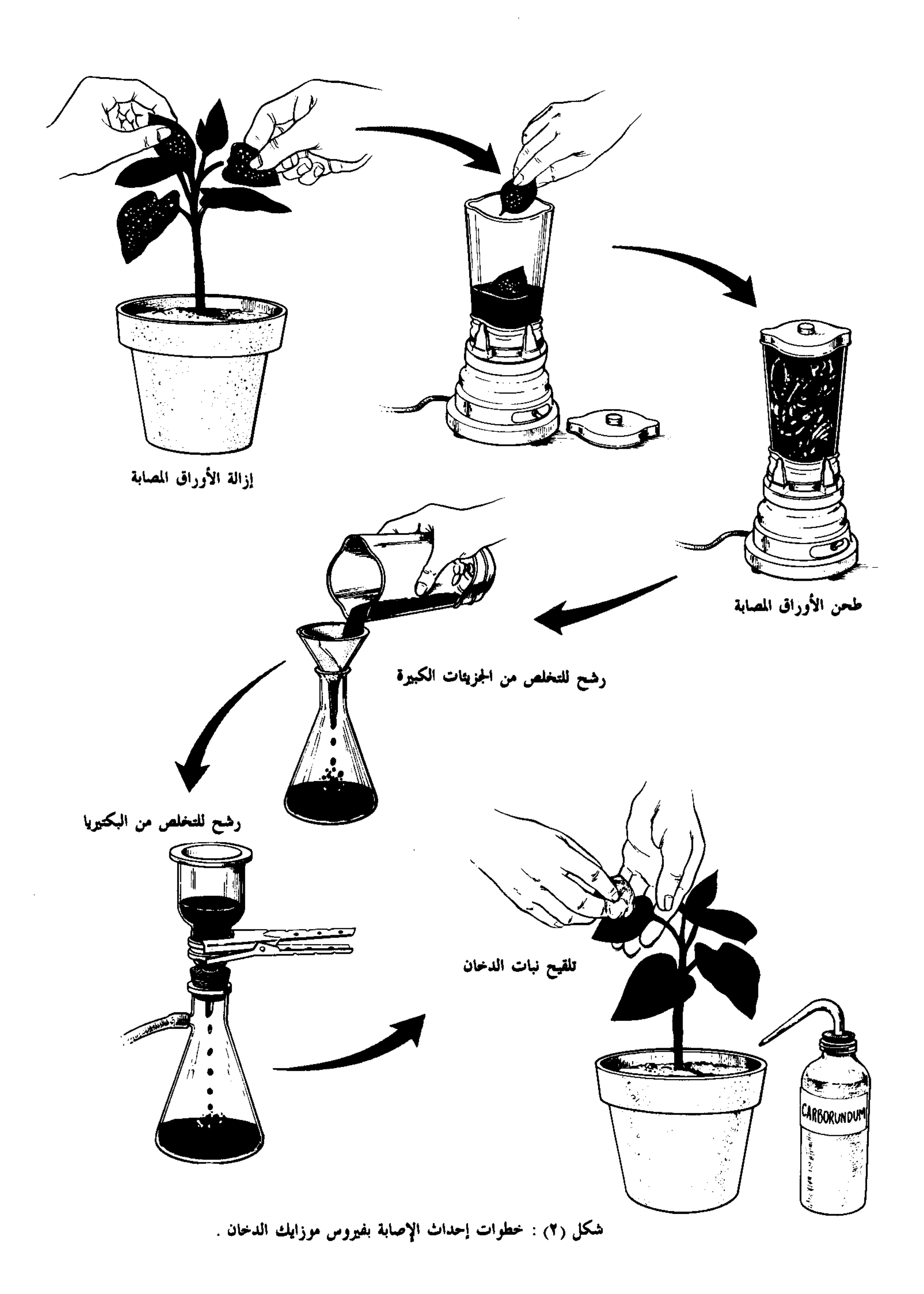
١ ــ أمام كل مجموعة من الطلاب نبات دخان مصاب . قم بإزالة الأوراق من النبات ، ثم اطحنها فى خلاط مع ١٠٠ ــ ١٥٠ مل ماء معقم .

٢ ــ رشح للتخلص من الجزيئات الكبيرة ، وذلك بالترشيح خلال قمع به ورقة ترشيح ، واجمع الراشح فى دورق .

٣ ــ اعد ترشيح الناتج من الخطوة رقم ٢ خلال مرشح بكتريولوجى ، والراشح النهائى سوف يحتوى على فيروس موزايك الدخان TMV .

٤ ــ أمام كل مجموعة من الطلاب نباتى دخان من صنفى NN ، Turkish . علّم ٢ ــ ٣ أوراق من كل نبات ، بوضع شريط لاصق صغير على طرف كل ورقة . وهذه الأوراق هى التى سوف تلقح .

٥ ــ رش قليلاً من مسحوق الكربوراندم على إحدى الأوراق التى سوف تلقح .



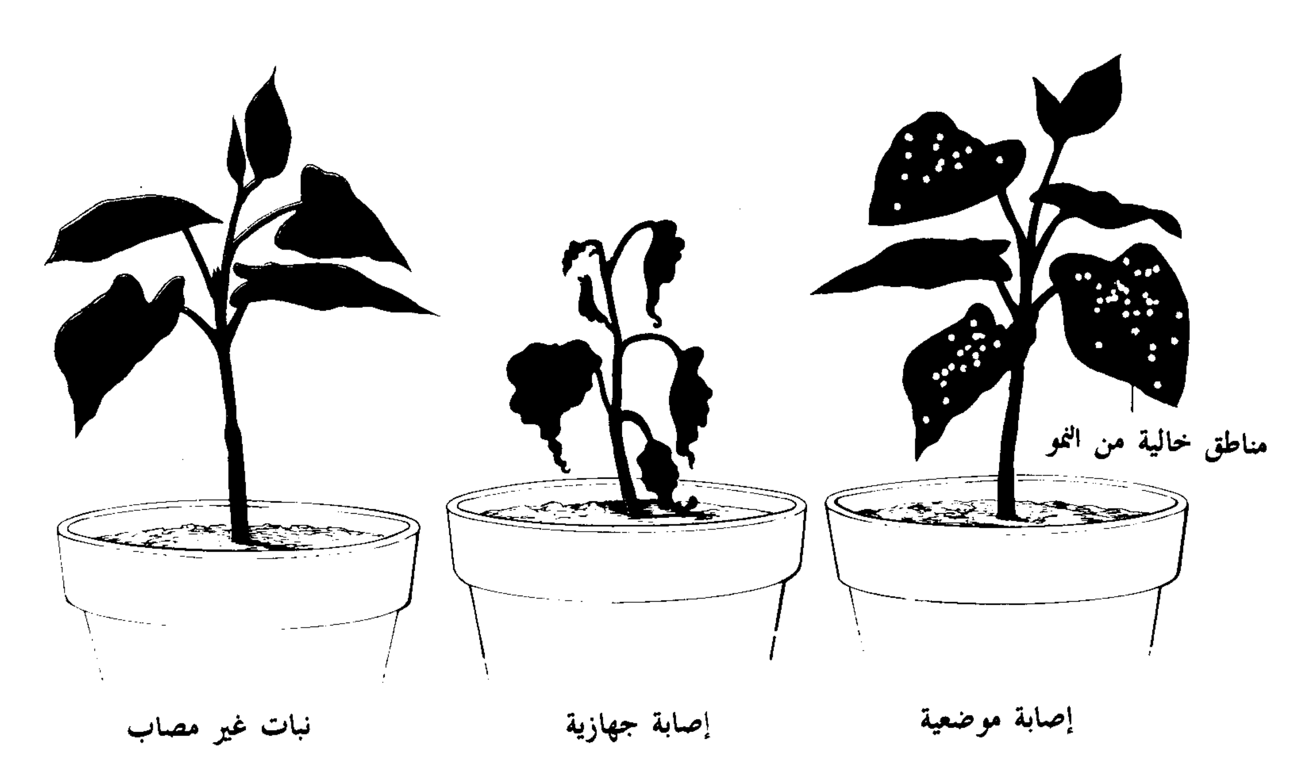
شكل (٢) : خطوات إحداث الإصابة بفيروس موزايك الدخان .

٦ ــ أدعك الورقة بقطعة من القطن مبللة فى الراشح الناتج من الخطوة رقم ٣ ، مع الحرص على عدم إحداث سلخ شديد فى الورقة .

٧ ــ اغسل الكربوراندم والزيادة من الفيروس من على الورقة بالماء المقطر ، باستخدام زجاجة غسيل .

٨ ــ كرر الخطوات من ٥ ــ ٧ على كل الأوراق المطلوب تلقيحها . وسوف يقوم مشرف الدرس بالمحافظة على مجموعة من النباتات غير المعاملة كمقارنة .

٩ ــ افحص النباتات فى كل درس عملى تالٍ لمده ٣ أسابيع لوجود كل من الإصابات الموضعية والإصابات الجهازية (أنظر شكل ٣) .



شكل (٣) : إصابة نبات الدخان بفيروس موزايك الدخان .

من المعروف أن بعض منتجات الدخان التجارية ، وخصوصا الأصناف الأجنبية قد تحمل فيروس موزايك الدخان . وإذا كنت مهتما بمحاولة عزل فيروس موزايك الدخان من هذه المنتجات ، عامل نبات دخان (من الأصناف التى تصاب إصابة موضعية بالفيروس) ، بطباق من أنواع مختلفة من السجائر ، أو بطباق البايب وغيرها . ويلاحظ أن أصناف الطباق الروسى والتركى تعتبر مصادر جيدة للفيروس .

QUESTIONS أسئلة

١ ــ ما هى الإصابة الفيروسية فى السلالة التركية Turkish من الدخان ؟ وما هى الإصابة التى تحدث فى السلالة NN ؟

٢ ــ فى النبات التى تظهر عليه إصابة جهازية ، أى الأوراق تظهر فيها الإصابة أولا ؟

٣ ــ كيف يتم انتقال أغلب الفيروسات النباتية ؟

٤ ــ كيف يمكن عمل تقدير كمى للفيروسات المسببة للمرض للنبات ؟

تدريب (٥٩)

زراعة الفيروس فى جنين بيض الدجاج

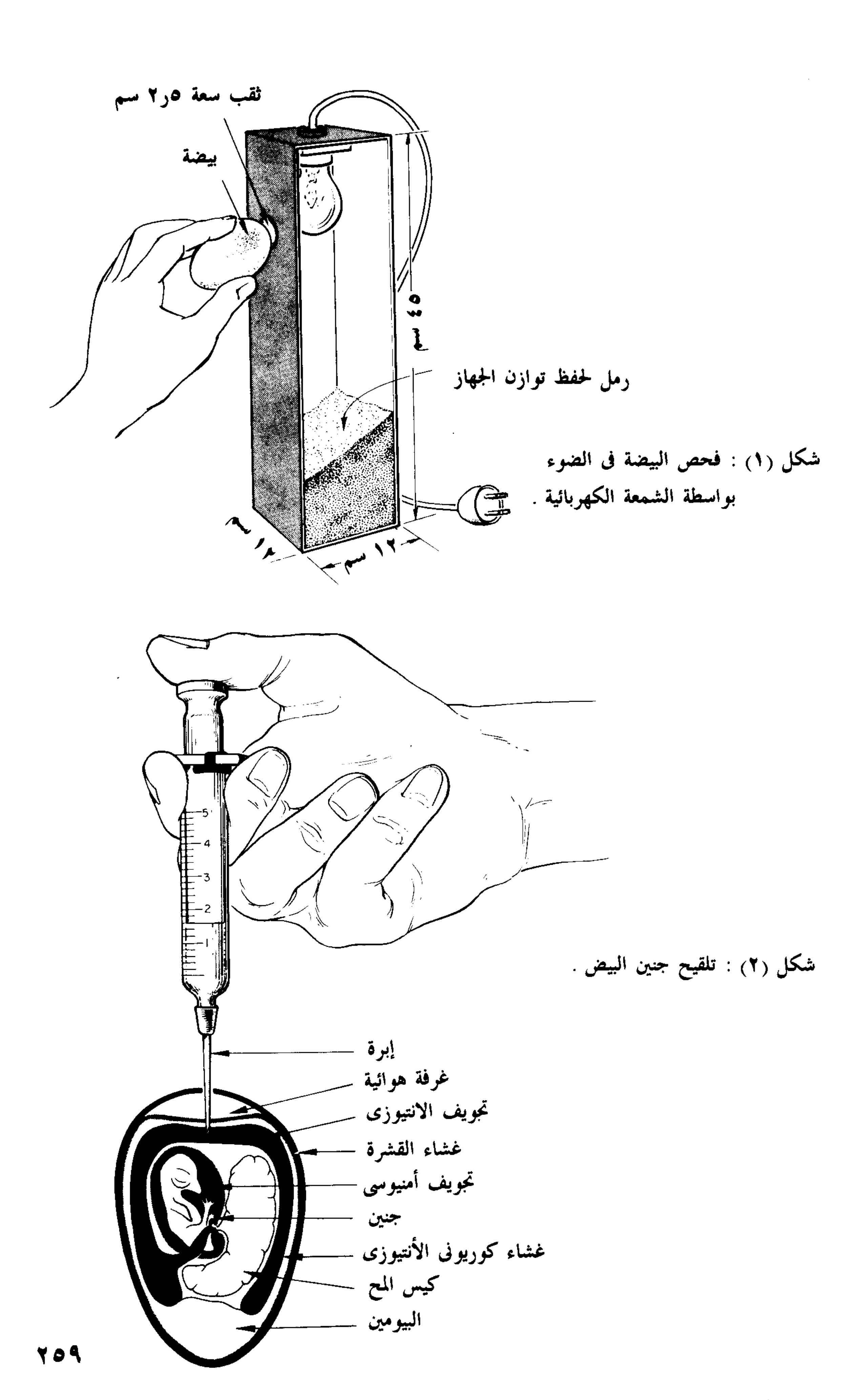
Virus Culture in Embryonating Chicken Eggs

الفيروسات متطفلة حتما ، ولقد كانت الطرق الأولى لتنمية الفيروسات المسببة للمرض للحيوان لأغراض الدراسة ، تستخدم إما العائل الطبيعى ، أو أحد الحيوانات المعملية الملائمة لزراعة الفيروسات . ولقد أظهرت الدراسات فيما بعد بخصوص زراعة فيروسات الحيوان ، أن جنين الدجاج النامى developing chick embryo ، يمكن استخدامه لزراعة كثير من هذه الفيروسات . ولما كانت الزراعة فى جنين الطيور أكثر اقتصادية من الزراعة فى حيوانات التجارب ، فقد استخدمت عادة فى عزل وتعريف ، وتقدير أعداد ، وحفظ كثير من فيروسات الحيوان ، وأيضا فى إعداد اللقاحات المضادة لها . وفى هذا التدريب .. سوف تشاهد على أجنة الدجاج chick embryos نمو فيروس مرض النيوكاسل New Castle disease virus الذى يصيب الدجاج .

PROCEDURE طريقة العمل

١ــ ضع بيضتين محتويتين على أجنة فى مواجهة الضوء باستخدام الشمعة الكهربائية ، بحيث يكون محوراهما الطوليان أفقيًّا ، ثم حدد وضَع علامة على موضع الغرفة الهوائية للبيضة (شكل ١) .

عقم قشرة البيضة فى منطقة الغرفة الهوائية ، وذلك بمسح المنطقة المعلمة بمحلول اليود مع الكحول الذى أمامك . عقم إبرة مقاس ١٨ بغمسها فى محلول قاتل للميكروبات ، ثم تعريضها للهب ، واستخدمها فى ثقب قشرة بيضة واحدة فى أعلى نقطة من الغرفة الهوائية **(انظر شكل ٢)** .



شكل (١) : فحص البيضة فى الضوء بواسطة الشمعة الكهربائية .

شكل (٢) : تلقيح جنين البيض .

تحذير : احرص على عدم ثقب الغشاء الموجود عند قاعدة الغرفة الهوائية . وفى الدراسات التى تجرى فى المعمل على أعداد كبيرة من البيض ، يستخدم ثاقب كهربائى لثقب القشرة .

٢ ـــ باستخدام حقنة سعة ١ مل وبإستخدام إبرة مقاس ٢٧ (٢ سم) .. لقح التجويف الأنتيوزى allantoic cavity بمعلق فيروس النيوكاسل المخفف الذى أمامك ، وذلك بإدخال الإبرة عمودية من خلال ثقب القشرة ، ثم إدخال كل طول الإبرة موازية للمحور الطولى للبيضة ، ثم احقن ٢ر٠ مل من المستحضر الفيروسى ، ثم اسحب الإبرة واغلق الثقب باستخدام مادة لاصقة duco cement أو شمع البرافين .

٣ ـــ كمقارنة .. احقن البيضة المخصبة الثانية بواسطة ٢ر٠ مل محلول ملحى معقم مستخدما الخطوات ١، ٢ ، ثم اغلق الثقب أيضا بالمادة اللاصقة أو شمع البرافين .

٤ ـــ حضن البيض على درجة ٣٧° م فى محضن يحتوى على صوانٍ بها ماء للمحافظة على رطوبة الجو المناسبة .

٥ ـــ افحص البيض الملقح تحت الضوء بواسطة الشمعة الكهربائية فى الدرس العملى التالى ، وذلك بالنسبة لموت الجنين ، والذى يمكن التأكد منه بتوقف الحركة ، أو اختفاء العروق من قشرة البيض . ويسبب فيروس النيوكاسل موت الجنين خلال ٣ ، أو ٤ أيام بعد التلقيح . وإذا تأكدت من موت الجنين اكسر قشرة البيضة ، وقم بتفريغ محتوياتها فى طبق بترى آخر . قارن شكل الجنين فى الحالتين ـــ لاحظ وجود أى علامات شاذة على جنين البيضة الملقحة ، مثل .. إصابات ، ووجود بقع مبتة ، ووجود نزيف دموى . (ملحوظة : إذا حدث الموت خلال ٢٤ ساعة من التلقيح ، فمعنى هذا أنه حدث بسبب إصابة بكتيرية ، وليس بسبب فيروس مرض النيوكاسل) .

تحذير : اغسل جيداً بالماء والصابون بعد هذه التجربة . لا تلمس عينيك ؛ حيث إن فيروس النيوكاسل يمكنه أن يسبب التهابًا لملتحمة العين conjunctivitis فى الإنسان .

أسئلة QUESTIONS

١ ـــ هل لمرض النيوكاسل أى أهمية فى صناعة الدواجن ؟

٢ ـــ كيف يمكن الحصول على الفيروسات المزروعة فى البيض ، لاستخدامها فى إعداد اللقاحات ؟

تدريب (٦٠)

زراعة الفيروسات فى مزارع الأنسجة

Cultivation of Viruses on Tissue Culture

مزارع الأنسجة عبارة عن تنمية الخلايا الحيوانية فى أنبوبة اختبار . وحيث إن الخلايا النامية فى مزارع نسيجية يمكن أن تعمل على نمو مختلف الفيروسات الحيوانية ، فإن هذه الطريقة أصبحت أداة حديثة لاكتشاف ، وتعريف ، ودراسة هذه الفيروسات .

ويعتبر جنين الدجاج من أحسن مصادر الخلايا لعمل مزارع الأنسجة . ويمكن الحصول على الخلايا من أجنة الدجاج وزراعتها كما هو موضح فى شكل (١) .

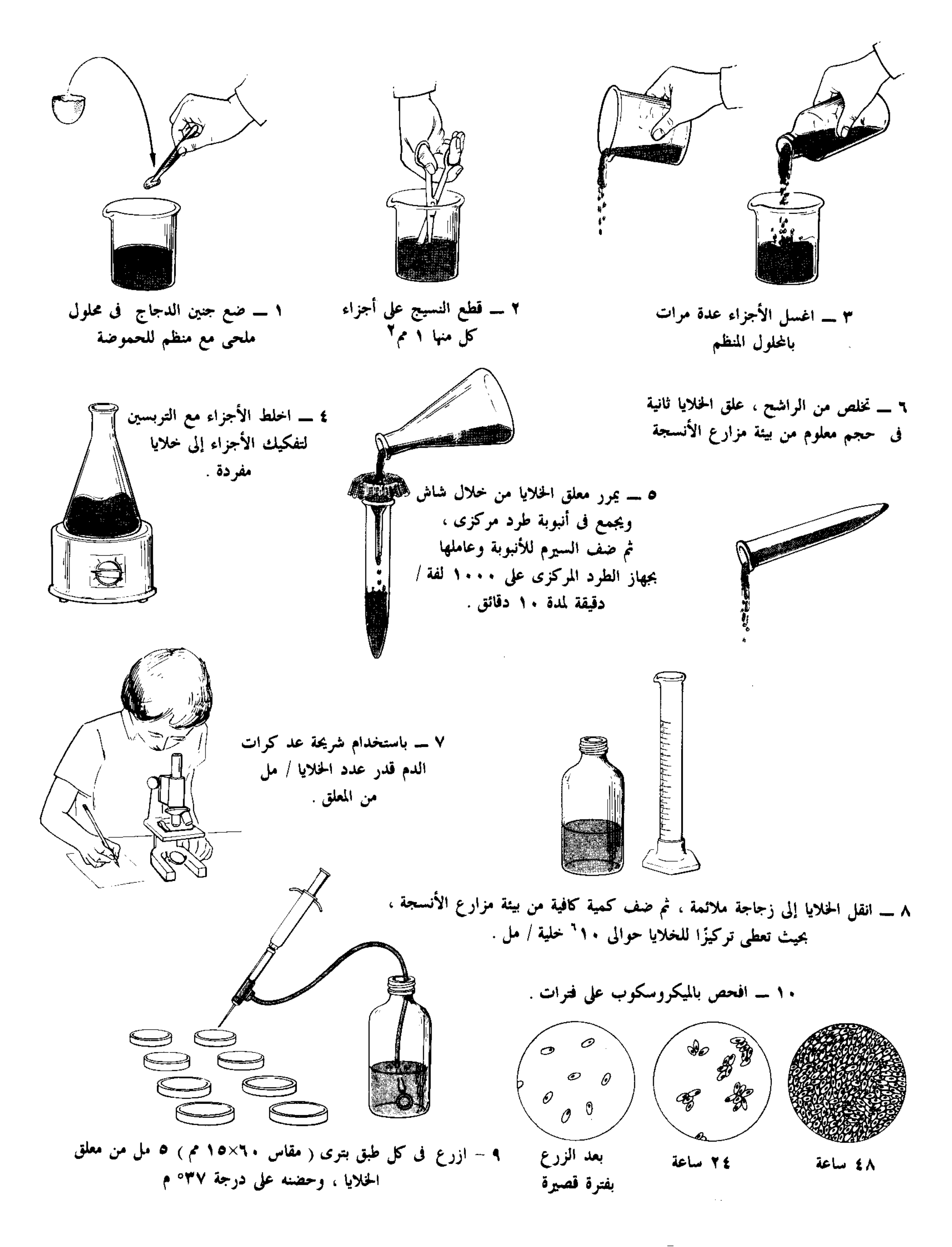
وإذا زرعت هذه الخلايا فى بيئة سائلة .. فإنها لا تطفو بحرية ، ولكنها تلتصق بأى سطح صلب كالزجاج ، أو أى وعاء من البلاستيك غير السام ، حيث تنمو كخلايا أحادية الطبقة (سمكها خلية واحدة monolayer) من خلايا غير متميزة عن بعضها مورفولوجيًّا . ورغم أن طبقة الخلايا الأحادية النامية (وهى طبقة ناتجة عن خلية واحدة ، clone) تكون واضحة للعين المجردة ، إلا أن مكوناتها من الخلايا تكون ميكروسكوبية ويلزم لدراستها استخدام التكبير .

تؤدى إصابة المزارع النسيجية بالفيروس وتكاثره فيها ، إلى إحداث تغيرات فى خلايا العائل ، يطلق عليها اصطلاح cytopathic effect (CPE) (تأثير العامل الممرض على خلايا مزارع الأنسجة) . ومثالا على ذلك ، نجد أن إصابة خلايا كلية القرد بفيروس البوليو polio virus يسبب انكماشها واستدارتها ثم تحللها . أما فيروس الهربس herpes complex virus ، فإنه إذا مازرع فى مزرعة نسيجية من نفس الخلايا السابقة ، فإنه يسبب تكون خلايا عملاقة عديدة الأنوية giant multinuclear cells . وتسبب بعض الفيروسات ظهور مناطق خالية من النمو فى المزرعة النسيجية plaques ، تشابه المناطق الخالية من النمو فى حالة البكتريوفاج التى سبقت دراستها فى تدريب ٥٦ . ولأن كل فيروس يسبب تغيرات cytopathic effects مميزة له ، فإنه يمكن تعريف الفيروسات طبقا لهذه التغيرات التى تحدثها (انظر شكل ٢) .

هذا التدريب عبارة عن مقدمة فى زراعة مزارع نسيجية من خلايا الفيبروبلاست للدجاج ckickon fibroblast ، وإصابتها بفيروس النيوكاسل ، بهدف التعرف على التغيرات cytopathic effects الناتجة عن هذه العدوى .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ افحص اثنين من مزارع الأنسجة الأحادية الطبقة الناتجة عن خلايا فيبروبلاست الدجاج



شكل (١) : إعداد النسيج الأولى لعمل مزرعة نسيجية أحادية الطبقة (عن B.D. Laboratories, Inc.)

التى أمامك بالميكروسكوب ، وبالعين المجردة لكى تتعود على مظهرها العام . افحص لوجود غشاء خلوى واستطالة الخلايا .

٢ ــ تحت ظروف التعقيم .. اسحب البيئة من كل مزرعة نسيجية بحرص ، بحيث لا تسبب ضرراً للخلايا الأحادية الطبقة .


ب


أ


جـ

شكل (٢) : خلايا فيبروبلاست الدجاج العادية والمصابة بالفيروس .
(أ) خلايا سليمة
(ب) خلايا بعد ٢٤ ساعة من الإصابة
(جـ) خلايا بعد ٧٢ ساعة من الإصابة

٣ ــ لقح بحرص ٥ر٠ مل من مستحضر فيروس النيوكاسل فى إحدى المزارع النسيجية ، ولقح الأخرى بواسطة ٥ر٠ مل محلول ملحى به منظم فوسفاتى (PBS) كمقارنة . احذر أن تنفخ بشدة المزرعة النسيجية الأحادية الطبقة أثناء إضافة اللقاح .

٤ ــ رج المزرعة رجا خفيفا لتوزيع اللقاح المضاف فى خطوة رقم ٣ .

٥ ــ حضن المزارع النسيجية الأحادية الطبقة ، بحيث تكون الخلايا إلى أسفل ، على درجة ٣٧° م لمدة ساعة .

٦ ــ بعد مرور الساعة .. ضف لكل مزرعة تحت شروط التعقيم ٥ مل من بيئة مزارع نسيجية محتوية على ميثيل سليولوز Tissue-culture medium containing methyl cellulose .

٧ ــ حضن مزارع الأنسجة لمدة يومين على درجة ٣٧° م .

٨ ــ بعد يومين .. افحص المزارع النسيجية الأحادية الطبقة تحت الميكروسكوب ، لاحظ التغيرات الـ cytopathic effects فى المزرعة الملقحة . قارن مع مزرعة المقارنة غير الملقحة .

٩ ــ اسحب البيئة من المزرعة النسيجية الأحادية الطبقة .

١٠ ــ ضف ٤ مل من محلول ٥٪ فورمالين لكل مزرعة (لحفظها) واتركه لمدة ١٠ دقائق ، ثم اسحب الفورمالين من المزرعة .

١١ ــ ضف ١ مل محلول كرستال بنفسجى لكل مزرعة نسيجية ، واتركه ٥ ثوان ، ثم تخلص منه . اترك الخلايا المصبوغة تجف ، ثم افحصها لوجود مناطق خالية من النمو plaques فى المزرعة الأحادية الطبقة .

ملحوظة : ليست كل سلالات فيروس النيوكاسل قادرة على تكوين المناطق الخالية من النمو plaques

أسئلة QUESTIONS

١ ــ ما هو الـ explant (مزرعة أنسجة مفصولة من الكائن الذى نتجت منه) ؟

٢ ــ كيف يمكنك استخدام مزارع الأنسجة لعد الفيروسات ؟

٣ ــ هل تستطيع كل الفيروسات إصابة كل أنواع مزارع الأنسجة ؟

تدريب (٦١)

عد الفيروسات : طريقة تجمع الهيم

Enumeration of Viruses: Hemagglutination

يستطيع كثير من الفيروسات تجميع كرات الدم الحمراء (RBC's) التابعة لمختلفة أنواع الحيوانات . ويقوم الفيروس باستخدام الزوائد المدببة المسؤولة عن تجمع الهيم hemagglutinating spikes بالارتباط بمناطق الاستقبال الخاصة specific receptors (وهى عبارة عن ميكوبروتين يحتوى على حامض أستيل نورامينيك فى الطرف (mucoprotein with terminal n- actylneuraminic acid) ، فى كرتين دم حمراء فى وقت واحد مكونا رابطة بينهما . وعند وجود تركيز عال من الفيروس ، تتكون روابط تكفى لتُكون تجمعات كبيرة من كرات الدم الحمراء ، والتى يمكن ملاحظة تكونها بشكل التجمع فى قاع أنبوبة اختبار صغيرة .

تكون الخلايا غير المرتبطة حلقة ، تسقط إلى قاع الأنبوبة وتدور فى وسطها فى شكل زرار button . أما الخلايا المتجمعة المرتبطة .. فإنها تتراكم وتترسب فى القاع ، ولكنها لا تدور ، مكونة طبقة رقيقة من الخلايا الراسبة ذات حافة غير منتظمة مشرشرة serrated edge .

ولاختبار تجمع الهيم بواسطة الفيروس ، تعمل تخفيفات عشرية من معلق الفيروس ، ويتم خلط كل منها مع معلق معلوم التركيز من خلايا الدم الحمراء (تركيز ١٠^٧/ مل) . وفى هذا التقدير الكمى .. نجد أن مقلوب أقصى تخفيف أعطى أعلى تجمع كامل للهيم ، يعتبر معادلا لعدد الفيروسات فى العينة الأصلية virus titer . وهذه الطريقة غير دقيقة لأن عملية التخفيفات ، والعدد الذى نحصل عليه يعتبران نسبيان ؛ فهى فى الحقيقة لا تقدر العدد المطلق لحبيبات الفيروس الموجودة ، ولكنها تقدر عدد الوحدات المسببة لتجمع الهيم .

وهناك عدد من العوامل التى تؤثر على العدد الناتج من طريقة تجمع الهيم . فمثلا .. نجد أن السوائل البيولوجية مثل الدموع ، أو اللعاب ترتبط بالفيروسات ، وتجعلها غير حرة لترتبط مع كرات الدم الحمراء . كما أن حجم وشكل واتجاه الوعاء الذى يحتوى على الفيروس ، وكرات الدم الحمراء يؤثرون على نتائج العد ، أو تجعل من الصعب التأكد من النتائج . وفى العادة .. تستخدم أنابيب ١٣ × ١٠٠ مم ، ليس لها بروز من الزجاج بقاع الأنبوبة ، تحتوى على ١ مل من المحلول الكلى . وقد وجد أن استخدام حجم أكبر من المحلول فى أنبوبة بهذا الحجم يؤخر حدوث الترسيب . كما يجب ضبط أعداد كرات الدم الحمراء بدقة ، إما بعمل تحليل لكمية منها ، ثم قياس كمية الهيموجلوبين فى ناتج التحلل باستخدام جهاز قياس الألوان الضوئى photocolorimeter ، أو بعمل طرد مركزى على سرعة معينة لكمية منها فى أنبوبة طرد مخروطية مدرجة ، ثم تخفيف كمية مناسبة من الراسب يعتمد على كمية الخلايا الراسبة .

طريقة العمل PROCEDURE

يلاحظ أن الفيروس المستخدم فى هذا التدريب قد تم قتله بالتسخين على درجة ٥٦° م لمدة ٣٠ دقيقة .

١ ــ اعمل تخفيفات متضاعفة doubling dilutions من فيروس النيوكاسل (NDV) كالآتى : ضف ٥,٠ مل من المحلول الملحى إلى ٥,٠ مل من معلق الفيروس الذى أمامك . اخلط جيدا ، ثم انقل من المخلوط ٥ر٠ مل إلى أنبوبة جديدة ، وكرر العمل من خلال خمس أنابيب تخفيفات (تحصل على تخفيفات تتراوح بين ٢:١ حتى ٣٢:١) . استبعد ٥ر٠ مل من أخر أنبوبة تخفيف حتى تتساوى الحجوم ، واترك أنبوبة سادسة تحتوى على محلول ملحى فقط كمقارنة .

٢ ــ ضف ٥ر٠ مل من معلق ٢٥٪ كرات دم حمراء مأخوذة من الدجاج ، إلى كل من الأنابيب الستة السابقة . اخلط جيداً ، ثم اتركها ثابتة .

٣ ــ حضن الأنابيب على درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ ــ ٦٠ دقيقة .

وبدون أن يحدث أى رج للأنابيب ، تتبع عملية ترسيب كرات الدم الحمراء فى أنبوبة المقارنة ، حتى يصل خط الترسيب لقاع الأنبوبة المنحنى . ارفع حامل الأنابيب بهدوء إلى أعلى رأسك ، أو ضعه فوق مرآة ، ثم أفحص نظام التجمع فى قاع الأنابيب . وبمجرد أن تكّون أنبوبة المقارنة تجمعا لكرات الدم يشبه الزر ، حدد أخر أنبوبة من سلسلة الأنابيب التى أعطت طبقة منتظمة ناعمة smooth من الخلايا فى القاع ، وسجل مقلوب تخفيف هذه الأنبوبة على أنه يمثل عدد الفيروسات virus titer .

يتبع فيروس النيوكاسل (NDV) المستخدم فى هذه الدراسة مجموعة paramyxovirus ، ويسبب مرضا بالجهاز التنفسى فى الدجاج . وزيادة عدد هذا الفيروس فى السيرم تعتبر دليلاً على إصابة القطيع . وهذا الفيروس ينتج إنزيم neuraminidase ، وهو الإنزيم الذى يحلل مناطق استقبال الفيروس فى كرات الدم الحمراء ؛ مما يسبب انفصال الفيروس عن كرات دم حمراء جديدة ، ولكن كرات الدم الحمراء المنفصلة عن الفيروس لا يمكن استخدامها ثانية للتجميع مع فيروس NDV ، نظرا لتحلل مناطق استقبال هذا الفيروس . ومع هذا .. فإن هذه الكرات الدموية لازالت تحتوى على مناطق استقبال لفيروسات أخرى ، بحيث يمكن استخدامها فى دراسات تجمع هيم لفيروسات أخرى تابعة لنفس العائلة . وهذه الطريقة تسمى طريقة تدرج مناطق الاستقبال receptor gradient ، والتى يمكن استخدامها فى تعريف الفيروسات .

ويلاحظ أن تسخين الفيروس يفقده القدرة على إنتاج الإنزيم الذى يحطم مناطق الاستقبال ، وبهذا فإنه لا ينفصل عن كرات الدم الحمراء .

QUESTIONS أسئلة

١ ــ لماذا يترك الفيروس وكرات الدم الحمراء ليتفاعلا لمدة ساعة واحدة فقط ؟

٢ ــ بأى طريقة أخرى خلاف الحرارة .. يمكن منع الإنزيم الذى يحطم مناطق اتصال الفيروس بكرات الدم الحمراء من العمل ؟

٣ ــ ماذا يمكن أن يحدث لو تواجدت الأجسام المضادة لفيروس NDV أثناء التجربة ؟

٤ ــ صف كيف يمكن استخدام طريقة تدرج مناطق الاستقبال فى تعريف الفيروسات ؟

٥ ــ كيف يمكن أن يؤدى وجود أعداد زائدة من كرات الدم الحمراء إلى التأثير على نتائج العد بطريقة تجمع الهيم ؟

الباب الثانى عشر

الكائنات الحقيقية النواة

THE EUCARYOTES

يمكن أن تقسم الكائنات الحية الدقيقة إلى مجموعتين كبيرتين ، هما : الكائنات البدائية النواة Procaryotes ، والكائنات الحقيقية النواة Eucaryotes(*) ، وذلك على أساس الفروق الأساسية الموجودة بين المجموعتين فى التركيبات الدقيقة للخلية Cellular ultrastructure .

تُضم بدائية النواة : البكتيريا والسيانوبكتيريا Cyanobacteria (البكتيريا الخضراء المزرقة) . وتتميز خلايا بدائية النواة أساسًا بحجمها الصغير (بشكل عام) ، وعدم وجود جسيمات محاطة بأغشية بداخل الخلية ، ووجود نواة تتكون من DNA وحيد الكروموسوم وبدون غشاء نووى .

أما الميكروبات الحقيقية النواة .. فتضم الفطريات ، والطحالب ، والبروتوزوا – وتتميز خلاياها بأنها أكبر نسبيا فى الحجم ، وتحتوى على العديد من التركيبات الخلوية الدقيقة مثل : الميتوكوندريا ، والبلاستيدات الخضراء ، ووجود نواة محاطة بغشاء نووى .

فى هذا الباب ، ستكون لديك الفرصة لفحص بعض أنواع الخلايا الحقيقية النواة ، والتعرف على خواصها المميزة ، بينما تعاملنا فى تداريب سابقة مع الخلايا البدائية النواة أى البكتيريا . وبصفة أساسية .. فإن نفس الطرق السابقة ستستخدم فى تنمية ، ودراسة الميكروبات الحقيقة النواة .

البروتوزوا PROTOZOA

تتميز البروتوزوا بأنها ميكروبات متحركة ، بدون جدار خلوى ، وحيدة الخلية . وهى ميكروبات غير ذاتية التغذية ، مصدر الطاقة كيميائى عضوى Chemoheterotrophs ؛ أى أنها عضوية التغذية ، تحصل على الطاقة اللازمة لنموها بتحليل ، وأكسدة المواد العضوية ، وتحصل على المواد المغذية بطريقة من طرق الهضم ingestion يطلق عليها تعبير التغذية بالالتقام Phagotrophism . وغالبا ..

(*) على أساس الفروق الكيميائية فى تركيب الخلية ونشاطها التمثيلى ، فقد تم التعرف حديثاً على مجموعة مميزة عن معظم البكتيريا ، تسمى الأركيبكتيريا Archaebacteria ، ورغم أن هذه المجموعة تمثل مملكة ثالثة للكائنات الحية ، إلا أن التركيب الدقيق لخلاياها ، بصفة عامة ، يشبه تركيب خلايا الكائنات البدائية النواة .

فإن هذه المواد المغذية عبارة عن جسيمات دقيقة ، أو أنواع من الخلايا تتضمن البكتيريا ، والبروتوزوا الأخرى .

رغم هذه الصفات العامة المشتركة ، فإن البروتوزوا عبارة عن مجموعة خليطة ، تختلف كثيرا فى الحجم ، والشكل ، ومدى تعقيد تركيبها . ويفرق بينها أساسا بالوسيلة المستعملة فى الحركة ، وأيضا بواسطة طبيعة التركيب المورفولوجى ، والاحتياجات الغذائية والخواص الفسيولوجية ؛ فالبروتوزوا التى تتميز بحركتها الأميبية Amoeboid - type motility مثلاً .. توضع مع الأميبيات (ذات الأقدام الكاذبة) Class Rhizopoda . أما الهدبيات Ciliates (Class Ciliata) .. فإنها تتحرك نتيجة حركة متزامنة لمئات الأهداب cilia . وتتحرك البروتوزوا السوطية Flagellated بواحد ، أو أكثر من الأسواط flagella وتتبع Class Mastigophora .

يختلف الوضع بالنسبة للبروتوزوا الجرثومية التابعة لـ Class Sporozoa ؛ فإن أفراد هذه المجموعة غير متحركة ، أو تتحرك أحيانا بحركة زاحفة ، ومع ذلك .. فإنه فى أطوار معينة من دورة الحياة ، فإن بعض أفراد هذه المجموعة يتحرك بطرق أخرى ، ويظهر ذلك بوضوح فى جنس *Plasmodium* المسبب للملاريا ، حيث نجد إن الأنواع الناضجة غير متحركة ، بينما الأنواع غير الناضجة من دورة الحياة متحركة حركة أميبية بالأقدام الكاذبة Pseudopodia ، وتتحرك الجاميطات المذكرة بالأسواط .

تدريب (٦٢)

فحص بعض أنواع البروتوزوا Observation of Some Protozoa

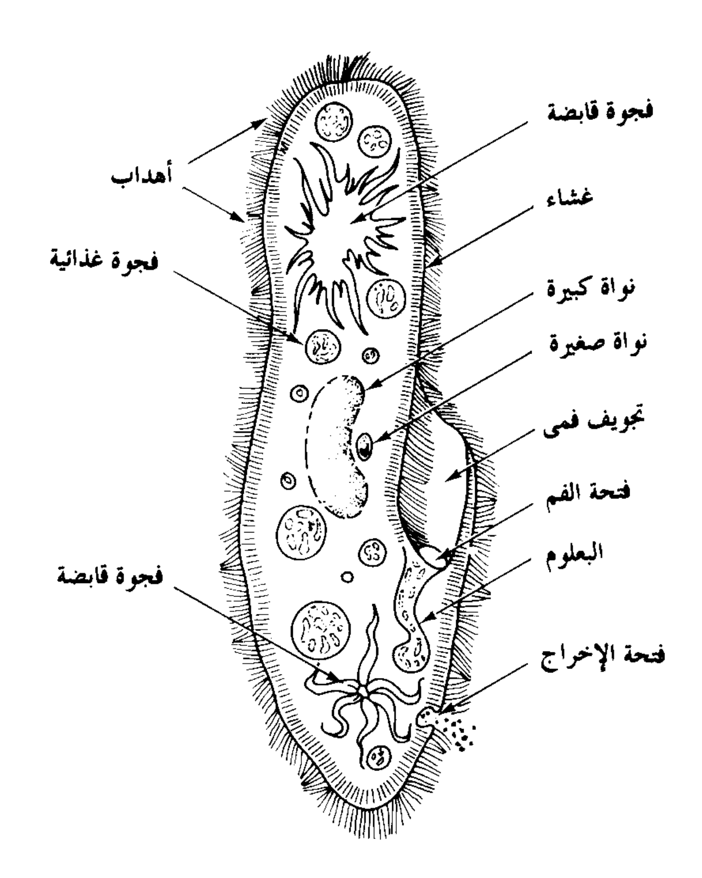
تتواجد البروتوزوا فى مجموعتين رئيسيتين :

١ - الطفيلية Parasites والمسببة للأمراض فى الحيوانات .

٢ - المترممة Saprophytes وهى تتواجد بكثرة فى المجارى المائية والمستنقعات ، والأراضى ، ومياه المجارى ، والأمعاء ، وكرش المجترات .

ومعظم البروتوزوا متحركة ، وأحد الأسس المستخدمة فى تقسيمها هو طبيعة العضو المستخدم فى الحركة .

والمصادر الجيدة للبرتوزوا هى رواسب مياه المستنقعات ، أو المحتويات الطازجة لكرش المجترات حيث تسود الهدبيات ، ومحتويات القناة الهضمية لحشرة الثرميت Thermite حيث تسود السوطيات ، وتحتوى المواد المترسبة من المعالجة الثانوية للحمأة النشطة activated sludge فى معاملة مياه المجارى ، على أنواع عديدة من البروتوزوا .



شكل (١) : بعض التركيبات الداخلية لخلية برتوزوا .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – باستعمال عينات من مياه المستنقعات ، أو من محتويات كرش المجترات ، أو من أى مصدر آخر مقدم لك ، اعمل تحضيرا مبتلا بإضافة جزء صغير من العينة السائلة إلى سطح شريحة ، مع التغطية بغطاء الشريحة .

٢ – افحص التحضير بالقوة الصغرى للميكروسكوب ، ثم بالقوة الكبرى الجافة . عرف بقدر الإمكان أكبر عدد من أنواع البروتوزوا ، وذلك بمقارنة الأنواع الموضحة بمراجع تقسيم البروتوزوا .

٣ – يمكن إبطاء سرعة حركة الهدبيات ، والسوطيات بزيادة لزوجة الوسط السائل المعلقة بها البروتوزوا . اعمل تحضيرا مبتلا كما فى خطوة رقم ١ مع إضافة نقطة من ميثيل السلليلوز ١٠٪ . افحص كما سبق .

٤ – افحص التحضيرات أيضا باستخدام الميكروسكوب المتباين الأطوار الضوئى ، وذلك للحصول على تفرقة واضحة لتركيبات الخلية الداخلية . استعن بشكل (١) للمساعدة فى تعريف تلك التركيبات .

٥ – اكتب قائمة بأجناس البروتوزوا التى عرفتها تعريفا مبدئيا من العينة ، واذكر أيضا التركيبات الداخلية التى أمكنك تمييزها .

أسـئلة QUESTIONS

١– ما هى الصفات الرئيسية التى تميز البروتوزوا عن الطحالب ؟

٢ – كثير من البروتوزوا يفقد بسرعة قدرته على الحركة عند نقله إلى الشريحة لفحصه ، ما الذى يسبب تقليل السرعة ؟

٣ – عند فحص الشرائح التى أعددتها ، هل وجدت خلايا بكتيرية ؟ وما هو حجمها بالنسبة للبروتوزوا ؟

٤ – فى المجارى المائية الملوثة بمياه المجارى ، عند نقطة حرجة أسفل أماكن صب مياه المجارى ، تقل أعداد البكتيريا ، وتزيد أعداد البروتوزوا – ما هى العلاقة ؟

الطحالب ALGAE

الطحالب ، مثل النباتات ، تقوم بعملية التمثيل الضوئى مستخدمة الطاقة الضوئية للنمو . توجد الطحالب فى الأماكن المعرضة للضوء بالأوساط المائية ، والأراضى الغدقة ، حيث لها دور أولى فى تكوين الوسط البيئى Primary Producers . تضم الطحالب مجموعة واسعة غير متجانسة من كائنات وحيدة الخلية وعديدة الخلايا . ومعظم أنواع الطحالب ميكروسكوبية ، ولكن بعضها مثل : قش البحر sea-kelp البنى العملاق ، يصل فى الطول لعدة أمتار .

يهتم المشتغل فى الميكروبيولوجى بأنواع الطحالب الميكروسكوبية ، التى تكون جزءا من الكتل الهائمة بحرية فى المصادر المائية ، والتى تسمى (بالهائمات المائية) Plankton . وهذه تتضمن البكتيريا الخضراء المزرقة Blue-green bacteria (وكانت تسمى سابقا بالطحالب الخضراء المزرقة) وهى ذات تركيب خلو بدائى النواة ، وتتضمن أيضا مجموعات عديدة متباينة من كائنات حقيقية النواة مثل : الدياتومات ، والطحالب الثنائية الأسواط Dinoflagellates ، والطحالب الخضراء . أما الطحالب الحمراء والبنية .. فإنها عادة ماكروسكوبية Macroscopic . وكل أنواع الطحالب (وكذلك البكتيريا الخضراء المزرقة) تنتج الأكسجين كناتج لعملية التمثيل الضوئى . وتختلف الطحالب فى هذا الخصوص ، عن بكتيريا الكبريت الخضراء والقرمزية وكذلك عن البكتيريا غير الكبريتية القرمزية .

نظرا لأن الهائمات المائية تشمل أعدادا كبيرة من الخلايا المختلفة مورفولوجيا .. فإن تعريفها – عدا الأنواع الشائعة المعروفة جيدا – ليس أمرا سهلا على المبتدئ . وفى التدريب التالى .. ستكون لديك فرصة لعد خلايا الهائمات المائية وفحصها .

تـدريـــب (٦٣)

فحص الهائمات النباتية Observation of Phytoplankton

قد تسبب مياه المجارى والمكونات الأخرى الغنية بعناصرها الغذائية ، زيادة كبيرة فى عدد وأنواع الطحالب الموجودة بمياه البحيرات ، والأنهار . وبالتالى .. فإن التغير الذى يحدث فى تركيز الطحالب ، وأنواعها يؤثر على التوازن الكيميائى للمياه ، وذلك نتيجة التأثير على الأكسجين الذائب ، والرقم الأيدروجينى ، والتعكير ، والرائحة ، والعوامل الأخرى الخاصة بنوع المياه . لذلك .. فإن إجراء تحليل للطحالب الموجودة بالمياه يعتبر أمرًا هامًا لتقدير جودة المياه .

إن عمل حصر للاتجاهات ، والتغيرات التى تحدث لأنواع ، وأعداد الطحالب يزدونا بمعلومات هامة ، كمية ونوعية ، عن جودة المياه ، وهل هذه المياه فى تحسن أم فى تدهور .

وتوفر المرشحات الغشائية Membrane filters مزايا هامة لهؤلاء الذين يجمعون ويحللون الطحالب . فهى طريقة سريعة وسهلة ، وتناسب الدراسات الميدانية ، وتسمح باستخدام القوة الكبرى للميكروسكوب لتعريف أنواع الطحالب . كما أن الشرائح المحضرة منها يمكن حفظها للدراسة لمدة طويلة .

ويمكن الحصول – بسهولة – على الأدوات ، والأجهزة الخاصة بفحص الهائمات النباتية الموجودة بالمياه ، بطريقة المشرحات الغشائية من : Millipore Corp., Bedford, MA 01730. ، وللحصول على معلومات أدق عن طريقة الاستعمال ، فيمكن الرجوع إلى :

1- Millipore Corp. publications numbered LAM 3020/ u, and LAP 3090/ u,
2- Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th Ed; 1957, published by the American Public Health Assocation.

تقدير كثافة الهائمات النباتية Determining Phytoplankton Density

١ – صل قمع المرشح filter holder بمصدر التفريغ (مضخة التفريغ) ، تأكد من وجود مصيدة للماء water trap (مثل زجاجة ترشيح ثانية) بين جهاز الترشيح ، والمضخة .

٢ – باستعمال ملقاط ذى طرف أملس ، ثبت على قمع المرشح ، مرشحا شبكيا HA type (سعة ثقوبه ٠,٤٥ ميكرومتر) .

٣ – بواسطة مخبار مدرج .. خذ حجمًا معلومًا من العينة ، صب العينة فى قمع المرشح أثناء تشغيل التفريغ . استمر فى سحب العينة خلال المرشح حتى يتبقى حوالى ٠,٥ سم فوق

المرشح . عند هذا الوضع .. افصل التفريغ . مع تقليل التفريغ ، المس برفق أنبوبة الدخول بذراع الزجاجة الجانبى المفتوح ، وببطء اسحب المتبقى من العينة خلال المرشح . بمجرد أن يتم مرور العينة من المرشح اوقف الترشيح . بهذه الطريقة ، ستمنع حدوث تلف لتركيبات الخلية الحساسة .

٤ – ضع بضع نقط من زيت الغمس الميكرسكوبى فوق شريحة مرقمة ، وبعناية باستعمال ملقاط ذى طرف أملس ، ارفع المرشح من قمع المرشح ، وضعه على زيت الغمس الموجود على الشريحة . اضبط خطوط شبكة المرشح مع حواف الشريحة ، مع تجنب حجز فقاقيع هواء .

٥ – ضع الشريحة فى فرن ، أو محضن على درجة ٦٠ – ٦٥° م ، حتى يصبح المرشح الغشائى شفافا منفذًا (حوالى ٤٥ دقيقة) ، وذلك نتيجة إحلال الماء الموجود بثقوب المرشح بزيت الغمس الذى له نفس معامل انكسار (١,٥) مادة المرشح الغشائى .

عندما يصبح المرشح الغشائى شفافا ، جهز تحضيرا مستديما بوضع ٢ نقطة دافئة من بيئة التحميل Mounting medium مثل : Permount فى وسط المرشح . بعناية .. ضع غطاء الشريحة على المرشح الموجود فوق الشريحة . عندما تبرد الشريحة ، اضغط ضغطًاخفيفًا على غطاء الشريحة بواسطة ممحاة القلم الرصاص .

إذا لاحظت وجود فقاقيع هواء تحت غطاء الشريحة ، دفئ الشريحة ثم عاود الضغط الخفيف على غطاء الشريحة . الحم حواف غطاء الشريحة بمحلول صقل أظافر رائق بحيث يضاف على مرتين ، أو أكثر .

٧ – افحص الشريحة ميكروسكوبيًّا . اختر عشوائيا خمسة مربعات من شبكة المرشح – عد الخلايا بكل مربع بطريقة متعرجة zigzag ، مستعملا تكبير × ١٠٠ .

٨ – احسب عدد الميكروبات لكل ١ مل عينة مستخدما المعادلة الآتية :

$$ع = \frac{\text{العدد بكل المربعات} \times ٢٥٥\ \text{م}^2}{ح \times \text{عدد المربعات المفحوصة بشبكة المرشح}}$$

حيث :

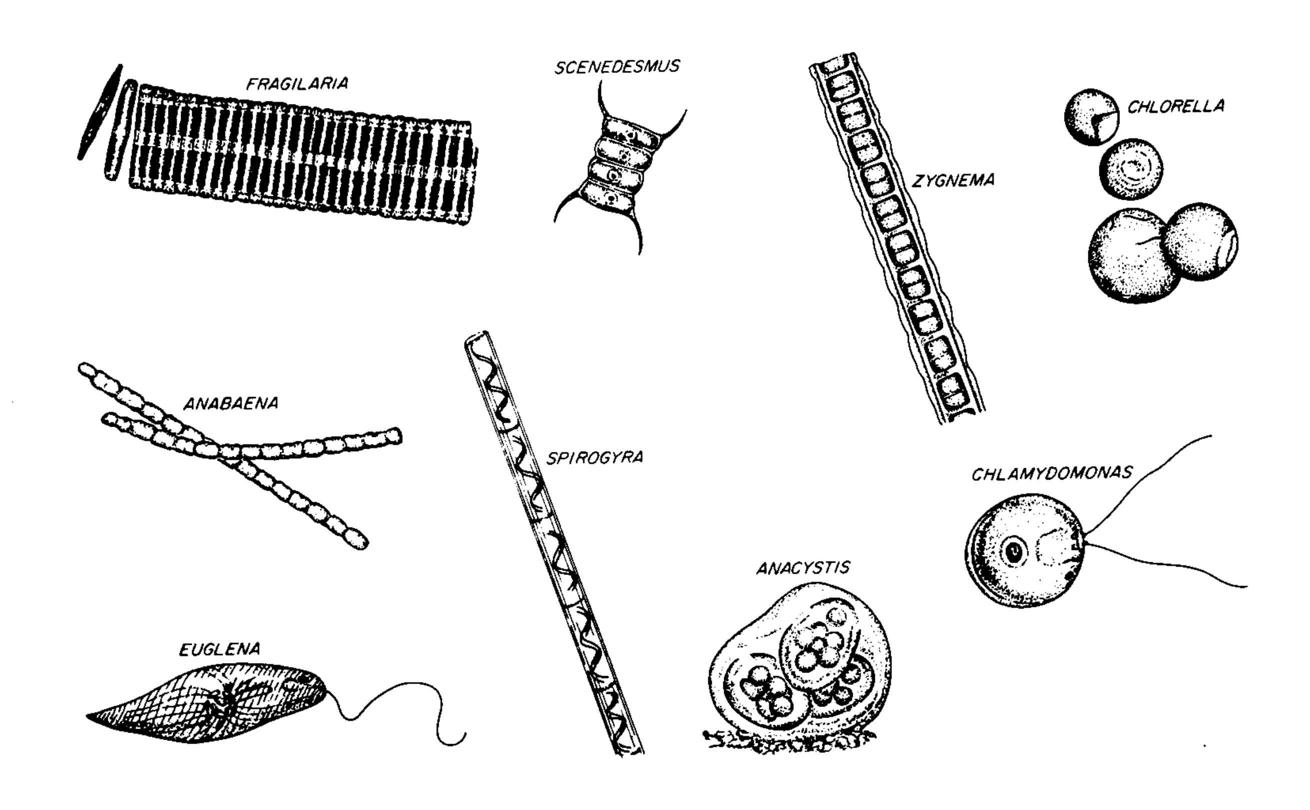
ع = عدد الميكروبات / مل عينة

٢٥٥ م^2 = المساحة المفحوصة لمرشح غشائى ٢٥ مم

ح = حجم العينة (المعدل بعد حساب التخفيفات)

إذا استعمل مرشح غشائى ٤٧ مم ، وتم عد ٥ مربعات من شبكة المرشح ، تستعمل المعادلة التالية :

$$ع = \frac{\text{العدد بكل المربعات}}{\text{حجم العينة (العدد بعد حساب التخفيفات)}} \times ٣٠,٣٣$$



شكل (١) : بعض أنواع الطحالب الشائع وجودها فى المياه .

تقدير التنوع فى الطحالب — Determining Species Diversity

بالإضافة إلى أعداد الطحالب .. فإن أنواع الطحالب الموجودة تعتبر دليلاً آخر للحكم على جودة المياه . مثلا .. عندما تكون المياه ملوثة ، يحدث انخفاض كبير فى عدد الطحالب الخضراء والدياتومات ، وتحدث زيادة فى عدد الطحالب الخضراء المزرقة (بكتيريا) وعدد السوطيات . لذلك .. فإن دراسة التنوع الذى يحدث بأنواع الطحالب ، تعتبر مفيدة للحكم على جودة المياه . يمكن استعمال تكبيرات عالية من × ٤٠٠ إلى × ١٠٠٠ لتعريف الطحالب المتجمعة على سطح المرشح الغشائى .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – اختر خمسة مربعات من شبكة المرشح بطريقة عشوائية .

٢ – افحص كل مربع بطريقة متعرجة zigzag مع عمل جرد لكل مجموعة من المجموعات السائدة ، مستعملا عدادا مناسبا للعد .

٣ – استعمل المعادلات السابقة لتقدير عدد طحالب كل مجموعة من مجاميع الطحالب الأربعة الرئيسية لكل ملليمتر عينة .

أسـئلة QUESTIONS

١ – هل كان هناك جنس معين سائد بالعينة ؟

٢ – فيم تختلف الهائمات المائية Plankton عن الهائمات المائية النباتية Phytoplankton ؟

٣ – هل تتوقع أن تجد البكتيريا الخضراء المزرقة نامية مع البكتيريا الأخرى الممثلة للضوء مثل : البكتيريا القرمزية غير الكبريتية ؟ لماذا ؟

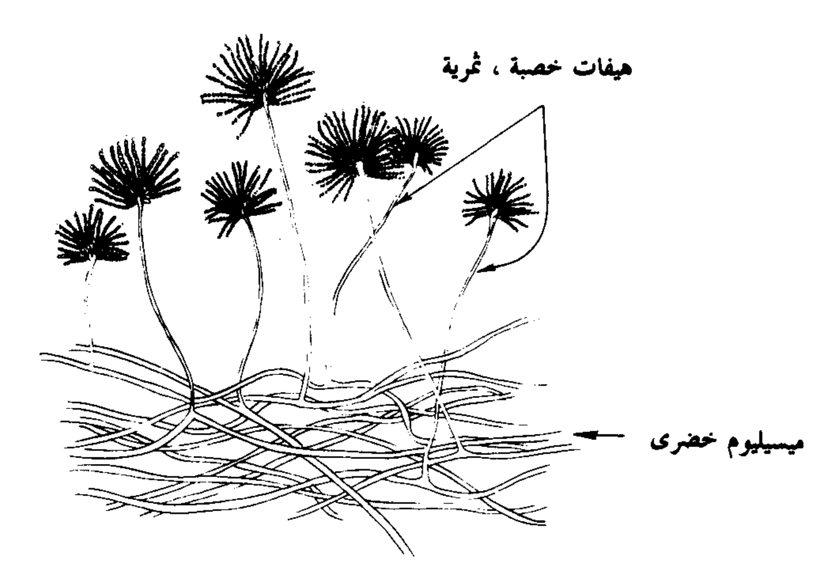
الفطريات : الأعفان ، والخمائر

FUNGI: MOLDS AND YEASTS

لقد لاحظ كل منا على الأغذية ، والمواد الأخرى ، وجود نمو قطنى cottony ، شبيه باللباد felt-like من الفطريات ، يسمى عادة بالأعفان (فطريات العفن) molds . ويوضح فحص الفطريات بعدسة بسيطة مكبرة ، وجود كتلة من الخيوط المتفرعة الملفوفة مع بعضها تسمى الميسيليوم (غزل فطرى) Mycelium . وبفحص خيط واحد من الميسيليوم ، ويسمى هيفا Hypha ، يتبين أن قطره يساوى من (٥ إلى ١٠) أضعاف قطر خلية البكتيريا الحقيقية التى فحصناها فى تدريبات سابقة .

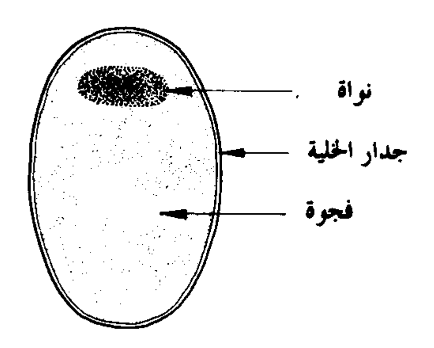
وينمو أغلب ميسيليوم الفطر خلال ، أو على سطح بيئة النمو ، ويعمل على استخلاص المواد اللازمة المغذية للنمو ، ويسمى بالميسيليوم الخضرى Vegetative mycelium . وتخرج من هذا الميسيليوم الخضرى ، أو تتكون من بعض أجزائه ، تركيبات ثمرية متخصصة تنتج الجراثيم اللاجنسية ، والجنسية asexual and sexual spores (انظر شكل ١٢ – ١) .

الخمائر Yeasts عبارة عن فطريات وحيدة الخلية شديدة الانتماء لفطريات العفن ، وخلاياها ذات شكل بيضاوى ، أو كروى ، أو أسطوانى ، وهى أكبر عدة مرات من خلية البكتيريا العادية ، وقطر خلية الخميرة يساوى تقريبًا قطر هيفا الفطر .



شكل (١٢ - ١) : تركيب الفطر .

بسبب كبر حجم خلية الخميرة.. تسهل رؤية تركيبات ومواد مخزنة عديدة ، بالميكروسكوب الضوئى ، كما أن استعمال بعض الصبغات المعينة مثل : صبغة فولجين ، يتيح رؤية النواة أيضا (انظر شكل ٢ - ٢) .



شكل (١٢ - ٢) : خلية خميرة .

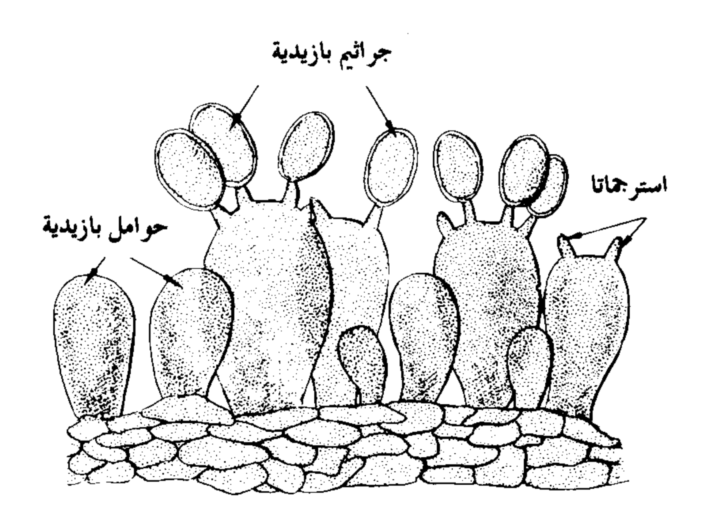
تتضمن الفطريات fungi كل من : فطريات العفن ، والخمائر . وتقسم الفطريات على أساس طريقة التكاثر الجنسى إلى أربعة صفوف Classes :

الفطريات الطحلبية (وقد تسمى بالفطريات الدنيئة) Phycomycetes . كثير من هذا الفطريات يشبه الطحالب ، ولكنها تختلف فى عدم احتوائها على كلوروفيل .

تتضمن هذه المجموعة من الفطريات كلا من : الفطريات المائية aquatic والأرضية terrestrial التى توجد فيها الجراثيم الجنسية - إذا ما تكونت - محمولة فى وضع مكشوف borne exposed ؛ أى بدون غطاء جرثومى .

الفطريات الأسكية Ascomycetes ، وهى تتميز بتكوين جراثيم تسمى جراثيم اسكية Ascospores توجد داخل كيس أسكى Ascus . وتتضمن هذه المجموعة بعض فطريات العفن مثل : جنس *Neurospora* ، والكثير من الخمائر .

الفطريات البازيدية Basidiomycetes هى الفطريات الممتلئة fleshy ، وتتضمن : عيش الغراب mushroom ، والفطريات المنتفخة الكروية puffballs ، وبعض الأنواع الممرضة للنبات المسببة للصدأ rusts ، والتفحمات smuts . تتكاثر هذه الفطريات جنسيا بواسطة الجراثيم البازيدية Basidiospores ، التى تقذف عند نضجها من الحوامل التى تسمى حوامل بازيدية Basidia ، وهى تنشأ من خلايا متخصصة منتفخة صولجانية الشكل غالبا . (انظر شكل ١٢ – ٣) .



شكل (١٢ – ٣) : قطاع فى فطر بازيدى .

الفطريات الناقصة (Deuteromycetes; Fungi imperfecti) تمثل مجموعة تقسيمية تضم بعض الخمائر وفطريات العفن التى لم يلاحظ فيها وجود تكاثر جنسى . ويتبع هذه المجموعة فطريات مرضية مثل : جنس *Trichophyton* المسبب لمرض قدم الرياضى Athlete's foot disease ، والنوع *Candida albicans* المسبب لعدوى بالزور تسمى مرض القلاع Thrush .

ويعتقد أن طريقة تكوين الجراثيم* الجنسية فى الفطريات – الشبيهة بالطحالب والأسكية والبازيدية – شديدة الارتباط بدرجة تطور وارتقاء هذه الفطريات ؛ فالجراثيم الجنسية للفطريات الشبيهة بالطحالب تُحمل بدون غطاء للجرثومة ، بينما تنتج الفطريات الأسكية جراثيمها الجنسية مغلفة فى كيس أسكى ، أما الفطريات البازيدية الأكثر تطورا .. فإنها تحمل جراثيمها الجنسية فى تركيبات عالية التطور .

(*) توجد لوحات ملونة من رقم ١ – ١٢ لبعض الميكروبات وانشطتها ، بآخر الكتاب .

تـدريــــب (٦٤)

مورفولوجيا ، وتكاثر الأعفان

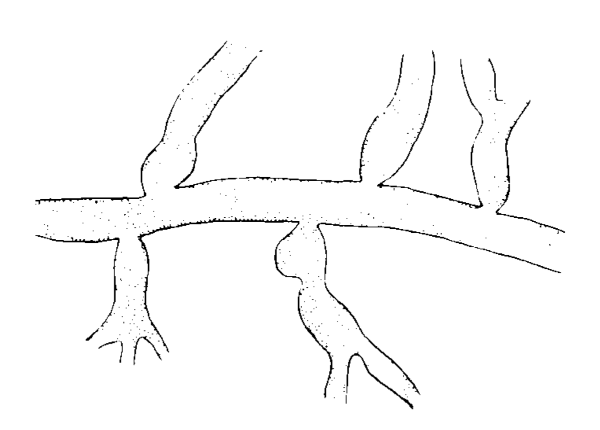
Morpholopy and Reproduction of Molds

تدرس وتقسم الأعفان (فطريات العفن) من خلال الاختلافات فى شكلها المورفولوجى ، وفى طريقة تكاثرها . وعند فحص هذه الفطريات .. فإننا نستخدم الاختلافات المورفولوجية الخاصة بـ :

١ - المستعمرة .   ٢ - الميسيليوم الخضرى .
٣ - تركيبات التكاثر سواء الجنسية ، أو اللاجنسية .

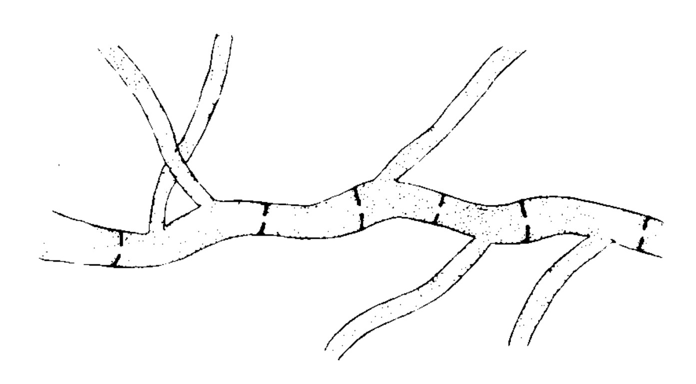
وتختلف مستعمرات الفطريات عن بعضها فى الحجم ومظهر السطح ، واللون . فنجد أن الفطريات الأسكية تميل لتكوين مستعمرات متباعدة ، بينما نجد أفراد الفطريات الطحلبية تنتشر على سطح طبق المزرعة ، حيث لا تظهر كمستعمرة ، بل تظهر فى شكل كتلة ليفية خشنة ، تحد حوافها فقط بالجوانب الزجاجية للطبق البترى . يرى النمو الأخضر المزرق لفطر البنسيليوم على الموالح ، أو فى الجبنة الزرقاء . ويتخذ اللون المميز للفطر ، الذى يعود أساسا إلى لون كتل الجراثيم اللاجنسية للفطر ، كوسيلة للتعرف عليه .

ويتكون الميسيليوم الخضرى للفطريات الطحلبية ، من هيفات غير مقسمة بجدر عرضية non-septated ، متعددة الأنوية Coenocytic ؛ فهذا الميسيليوم عبارة عن كتلة مستمرة من بروتوبلازم ، يحتوى على عديد من الأنوية توحد بين جدر الخلايا الأنبوبية الشكل للفطر (انظر شكل ١) .



شكل (١) : ميسيليوم متعدد الأنوية .

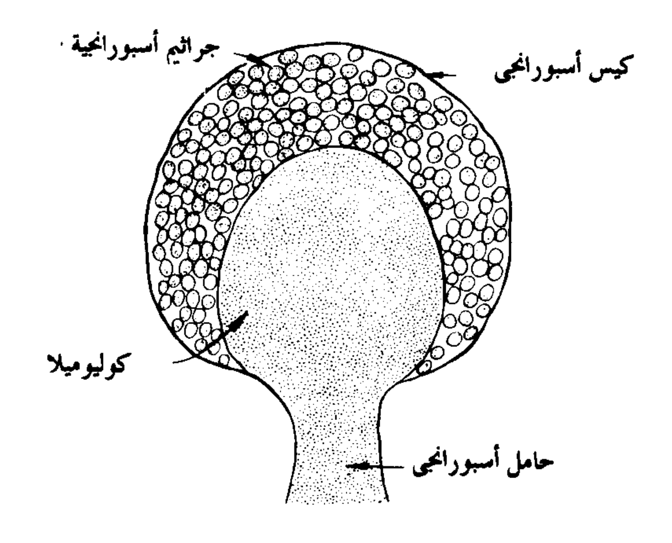
أما ميسيليوم الفطريات الأسكية .. فمقسم septated ؛ أى يتكون من خيوط مقسمة بجدر عرضية إلى خلايا فردية (انظر شكل ٢) .



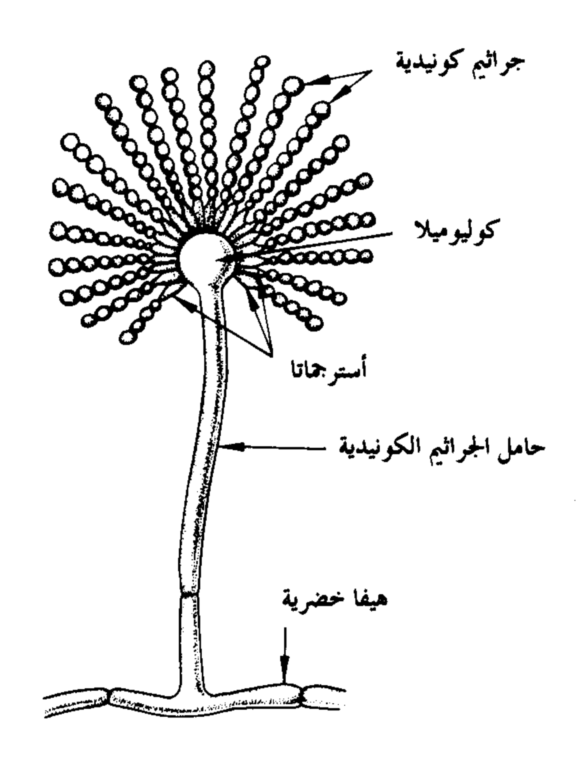
شكل (٢) : ميسيليوم مقسم .

وتخرج من الميسيليوم الخضرى للفطريات حوامل متخصصة ، تحمل الجراثيم اللاجنسية asexual ، التى تعتبر الوسيلة الأولية للتكاثر فى الفطريات ، وهى تتكون بأعداد ضخمة ، وتنتقل إلى أوساط قريبة ، أو بعيدة بواسطة التيارات الهوائية . ولكل جرثومة القدرة على الإنبات لتكون فطرا ناضجا ، إذا ما كانت ظروف الوسط الجديد مناسبة . الفطريات الطحلبية تكون جراثيم أسبورانجية Sporangiospores ، وهى جراثيم لاجنسية توجد داخل حافظة تسمى كيس أسبورانجى Sporangium (انظر شكل ٣) .

وتكون الفطريات الأسكية جراثيم كونيدية Conidiospores ، وهى جراثيم لاجنسية غير مغلفة (انظر شكل ٤) .

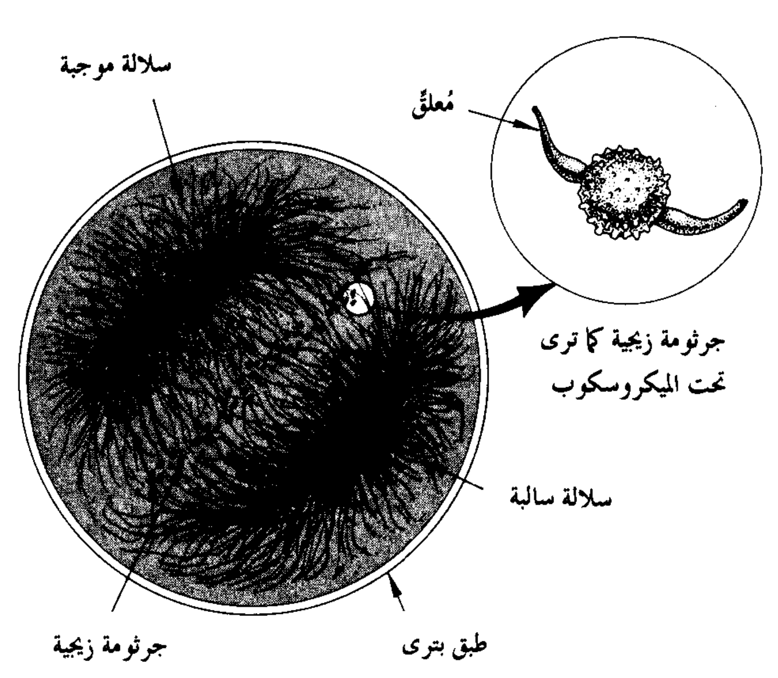


شكل (٣) : الكيس الأسبورانجى لفطر طحلبى .



شكل (٤) : التركيب الحامل للجراثيم للفطر الأسكى Aspergillus .

وتتكاثر الفطريات جنسيا – بدرجة أقل – باتحاد هيفتين ليكونا جاميطات gametes ، والتى منها تتكون الجراثيم الجنسية . فى بعض أنواع الفطريات الطحلبية تتكون الجراثيم الجنسية (وتسمى جراثيم زيجية zygospores) مفردة ، وبدون غطاء (انظر شكل ٥) .



شكل (٥) : تكوين جرثومة زيجية بين سلالتين لفطر *Rhizopus* .

وتسمى الجراثيم الجنسية للفطريات الأسكية جراثيم أسكية Ascospores ، وتنتج داخل كيس أسكى Ascus ، حيث تتكون جراثيم عديدة نتيجة الاتحاد الجنسى .

طريقة العمل — PROCEDURE

الفحص المورفولوجى — Morphology

أمامك مزارع أطباق ، ومزارع شرائح (غرف رطبة Moist chambers) لأجناس عديدة من الفطريات .

١ – افحص مزارع الأطباق ، لاحظ مظهر المستعمرة ، والنمو ، وحجم ، ولون ، ومظهر كل فطر .

٢ – بواسطة القوة الصغرى للميكرسكوب .. افحص كل فطر بمزرعة طبق الآجار . افحص حافة وتركيب المستعمرة . ضع غطاء شريحة على النمو ، وافحص بالقوة الكبرى الجافة . لاحظ صفات الهيفا ، والخلايا الثمرية ، والجراثيم .

نظرا لكبر حجم الفطريات نسبيا .. فإنك سترى تركيبا واحدا فقط ، أو جزءاً من التركيب فى أى مجال فحص ميكروسكوبى للفطر . لذلك .. فإنه عند فحص الفطريات بالقوة الكبرى الجافة ، يجب أن تحرك مجال الفحص ، ومستوى البعد البؤرى لكى ترى التركيب كاملا .

٣ – افحص التحضير الخاص بالغرف الرطبة (للفطريات المناة على شرائح) بطريقة مماثلة لما تم فى رقم ٢ .

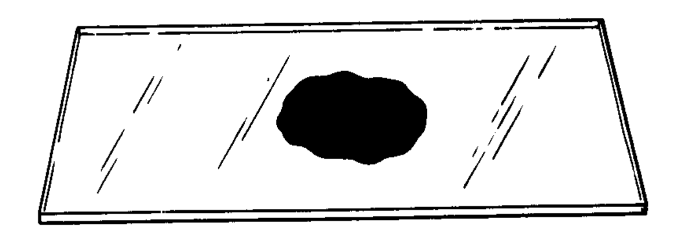
٤ – ارسم ما تشاهده محاولا الربط بين ملاحظاتك عن فحص مزارع الأطباق ، ومزارع الشرائح ، وذلك لتوضيح نمو المستعمرة ، ، والميسيليوم الخضرى ، والتركيبات الثمرية التى تمكنت من فحصها .

كيف تحضر الغرف الرطبة لتنمية مزارع الفطريات
How to Make Moist Chambers for Growing Mold Cultures

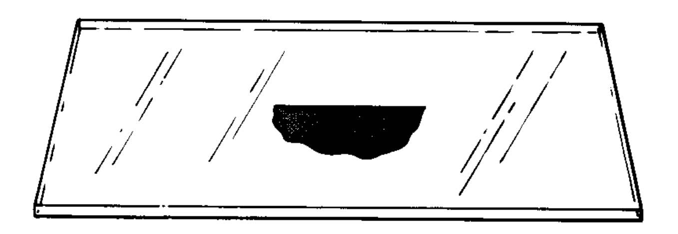
١ – عقم طبق بترى يحتوى على ورقة ترشيح تغطى قاع الطبق .

٢ – اغمس شريحة نظيفة فى الكحوْل ، ثم مررها باللهب حتى يتم حرق الكحول . ضع الشريحة على ورقة الترشيح بالطبق .

٣ – بعد أن تبرد الشريحة .. انقل بماصة معقمة تحت شروط التعقيم قطرة من آجار الجلوكوز المنصهر إلى سطح الشريحة ، ثم اتركه ليتصلب .

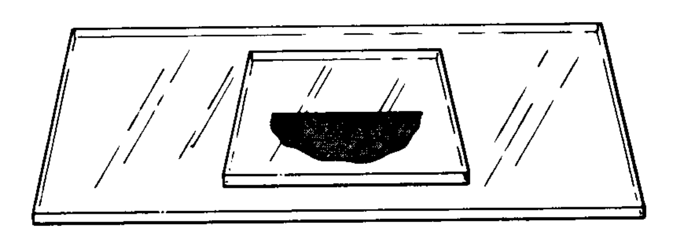


٤ – باستعمال الإبرة ذات العقدة المبردة .. قطع شرائح Slices بإحدى حواف قطرة الآجار حتى تحصل على سطح مستو .

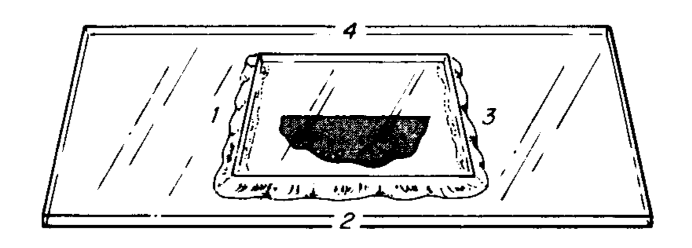


٥ – لقح السطح المستوى بالفطر .

٦ – ضع غطاء شريحة معقمًا على قطرة الآجار .

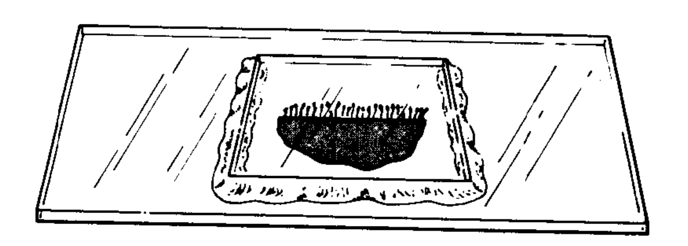


٧ – بفرشاة صغيرة .. ادهن بالفاسبار السائل حول جوانب غطاء الشريحة ١ ، ٢ ، ٣ ، تاركاً الجانب الرابع مفتوحاً للهواء .



٨ – ضف ١ ، أو ٢ مل ماء معقم لورقة الترشيح لتكوين جوا رطبا أثناء التحضين .

٩ – غط طبق البترى بغطائه ثم حضن الغرف الرطبة على درجة ٢٥° م . استمر فى ترطيب ورقة الترشيح يوميًّا حتى ينمو الفطر للدرجة المطلوبة .



التكاثر الجنسى Sexual Reproduction

للفطر الطحلبى المسمى *Rhizopus nigricans* سلالتان مميزتان جنسيا ، تسميان سلالة موجبة ، وسلالة سالبة .

١ – حضر طبق آجار بطاطس potato agar plate . لقح أحد جوانب الطبق بالسلالة الموجبة للفطر *R. nigricans* ، ولقح الجانب المقابل بالسلالة السالبة .

ضع على ظهر الطبق علامات لتميز الجانب الموجب والجانب السالب .

٢ – حضن الأطباق الملقحة على درجة ٣٠° م لمدة ٧ أيام .

٣ – افحص بالقوة الصغرى ، والكبرى الجافة للنمو ولتكوين جراثيم زيجية . ستفحص مميزات الجراثيم الأسكية للفطريات الأسكية فى التدريب التالى رقم ٦٥ .

أسـئلة QUESTIONS

١ – تشتق أسماء أجناس كثيرة من الفطريات من بعض صفات مورفولوجية معينة . مم اشتقت أسماء أجناس *Penicillium, Aspergillus and Rhizopus* ؟

٢ – إذا كانت لديك مزرعة خليطة من فطر وبكتيريا ، ما هى الطريقة الانتقائية بالأطباق التى يمكنك أن تستخدمها لعزل كل ميكروب فى مزرعة نقية ؟

٣ – من أى جزء من دورة الحياة تنشأ السلالة الموجبة ، والسلالة السالبة ؟

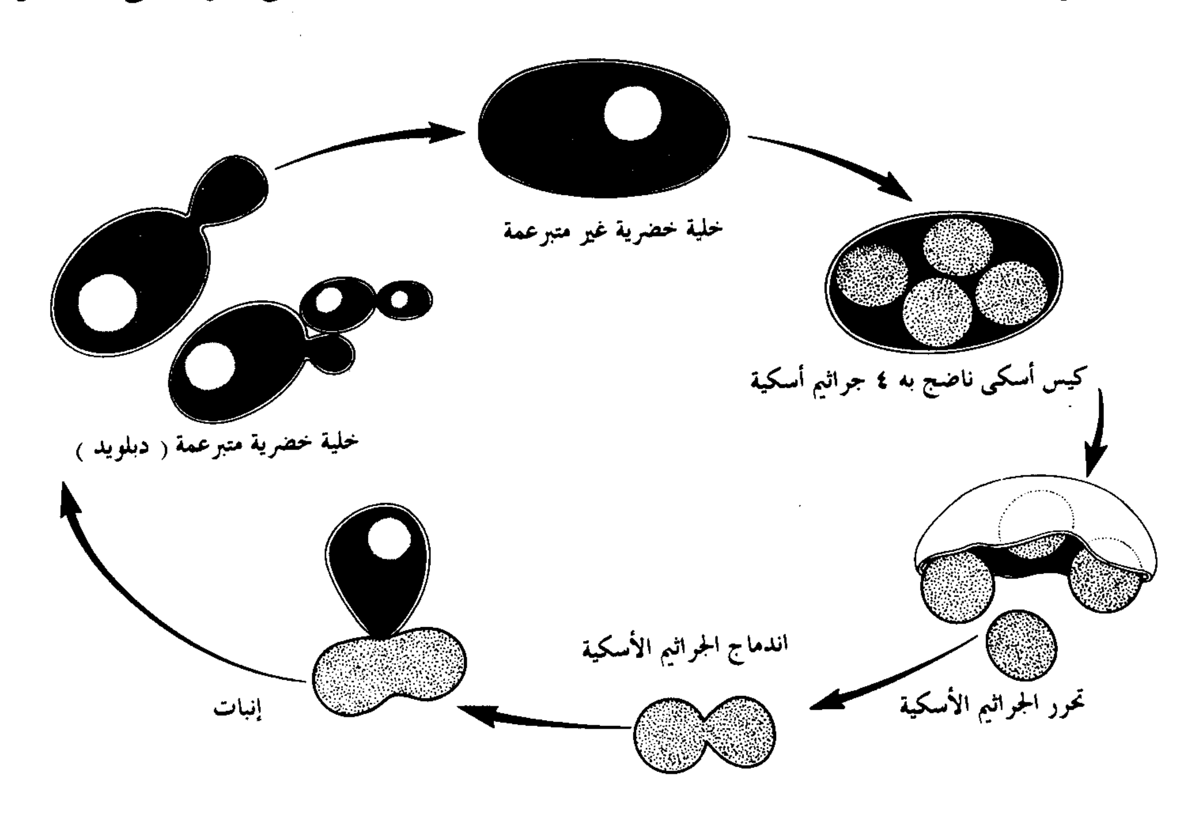
تدريـــب (٦٥)

مورفولوجيا وتكاثر الخمائر

Morphology and Reproduction of Yeasts

تتكاثر معظم الخمائر أساسا بطريقة لاجنسية تسمى التبرعم Budding . فى هذه الطريقة .. يبرز نمو من الخلية الأم ، وينفصل أخيرا مكونا خلية بنوية Daughter cell . ويتم التكاثر الجنسى فى بعض الخمائر الحقيقية True yeasts (وتتميز بأنها تكوّن جراثيم جنسية) ، بواسطة التزاوج بين جرثومتين أسكيتين ، ويتبع ذلك تكون خلية خضرية حدث بها اندماج النواتين مكوناً نواة واحدة ، ذات كروموسومات زوجية المجموعة Diploid . تنقسم النواة الناتجة إلى أربع (أو أقل) نويات . تنضج كل نوية ، وذلك بتغليف النواة بمواد مخزنة ، ثم يحاط بغلاف الجرثومة ، وتكون جرثومة أسكية . توجد الجراثيم الأسكية بالخلية الأم داخل كيس أسكى Ascus ، والذى يتمزق وتتحرر منه الجراثيم . وعند توفر الظروف المناسبة للنمو .. تتزاوج الجراثيم الأسكية الناتجة من سلالات مختلفة ، وتنبت لتكوّن خلايا خضرية ناضجة ، وتستمر الدورة (انظر شكل ١) .

يوضح التدريب التالى الشكل المورفولوجى ، وطريقة التكاثر اللاجنسى ، والجنسى بالخمائر .



شكل (١) : دورة حياة خميرة نموذجية *Saccharomyces cerevisiae* .

PROCEDURE — طريقة العمل

Morphology: Vegetative Cell — الشكل المورفولوجى للخلية الخضرية

١ – جهز تحضيرا مبتلا ، بنقل غمسة إبرة من كل مزرعة مقدمة لك إلى محلول يود مائى water-iodine (٣ نقط من الماء مع نقطة من محلول يود صبغة جرام) ، ثم غط كل تحضير بغطاء شريحة .

٢ – افحص كل تحضير تحت القوة الكبرى الجافة ، ولاحظ الشكل المورفولوجى للخمائر ، وأى تركيب داخلى يمكن رؤيته . افحص عدة مجالات ميكروسكوبية لتشاهد خلايا متبرعمة .

Sexual Reproduction: Ascospores — التكاثر الجنسى : الجراثيم الأسكية

١ – من الخلايا النامية على بيئة الجلوكوز والخلات glucose-acetate medium ، حضر شرائح ، واصبغ بصبغة أخضر الملاكيت الخاصة بصبغ الجراثيم ، ولكن لا تستعمل حرارة .

٢ – افحص بالعدسة الزيتية للجراثيم الأسكية .

٣ – ارسم موضحا التركيب الذى شاهدته .

تتكون الجراثيم الأسكية للخميرة بدرجة تكفى لفحصها بسهولة ، فقط عندما تنمو المزارع تحت ظروف مناسبة . وقد استعملت بيئة الجلوكوز ، والخلات فى هذا التدريب – تحت شروط التعقيم – لتشجيع تكوين الجراثيم الأسكية (بيئة تجرثم الخميرة) .

QUESTIONS — أسـئلة

١ – من نتائج الفحوص التى أجريتها ، هل يمكنك أن تستنتج إذا ما كان تكون الجراثيم يحدث بدرجة أكبر بين الفطريات ، أم بين الخمائر ؟

٢ – بعض الأنواع الميكروبية تعمل كحلقة وصل تربط الفجوة الموجودة فى الشكل المورفولوجى بين الفطريات والخمائر . ما هى هذه الأنواع ، وما هى الصفات التى تشترك فيها مع كل مجموعة ؟

٣ – ماذا يعنى تعبير "Saccharomyces" ؟

تدريـــب (٦٦)

تعريف الفطريات Identification of Fungi

تعتبر الفطريات السريعة النمو كملوثات بالمعامل عادة ، فبعضها مثل : *Geotrichum* يلعب دورًا هاما فى الصناعات الغذائية ، والبعض الآخر هام من الناحية المرضية مسببا أمراضا مثل : مرض الأسبرجيللوسيس Aspergillosis ، ومرض القلاع Thrush ، وأمراض الحساسية Allergies . ويمكن تعريف الفطريات بواسطة لونها ومظهر الأكياس الأسبورانجية ، وحجم وشكل ونظام ترتيب الجراثيم .

فالفطريات الطحلبية Phycomycetes لها هيفات متفرعة بدون جدر عرضية ، وعادة فإن نموها يملأ طبق البترى بالميسيليوم بدلا من تكوين مستعمرات متباعدة . جراثيمها اللاجنسية مغلفة . وبعض من هذه الفطريات الطحلبية يوجد فى أوساط مائية .

أما الفطريات الأسكية Ascomycetes .. فإن هيفاتها ذات جدر عرضية ، ولكن جراثيمها اللاجنسية عارية . يغلف الكيس الأسكى الجراثيم الجنسية . ويعتبر Aspergillus أحد الأمثلة لهذه الفطريات .

تتميز الفطريات البازيدية Basidiomycetes بتركيب ثمرى كبير هو حامل بازيدى Basidium يحمل الجراثيم البازيدية . يمثل هذه المجموعة فطريات الصدء والتفحمات .

بينما لاتتميز الفطريات الناقصة Deuteromycetes ، بأن لها أطواراً جنسية معروفة ، وهذا هو الأساس فى وضعها فى هذا القسم .

فى التدريب التالى .. ستقوم بتعريف الفطريات المقدمة لك على أساس مميزاتها التركيبية .

طريقة العمل PROCEDURE

١ - أمامك مزرعة شريحة فى طبق بترى Petri slide culture .

٢ - ضع الشريحة على مسرح الميكروسكوب ، وافحص المزرعة مستعملا تكبير × ١٠٠ ، × ٤٠٠ . لاحظ تركيب حوامل الجراثيم متبدئًا الفحص من السطح المقطوع لآجار البطاطس والدكستروز Patato-dextrose agar . حرك عدسة المكثف والإضاءة لأبعد ما يمكن عن مسرح الميكروسكوب لتجنب تكثف الماء فى الميسيليوم الذى يكون أشكالا غير حقيقية Artifacts .

٣ - افحص مزارع الشريحة الخاصة بثلاثة طلاب قريبين منك ، ارسم واكتب البيانات على الرسم ، ودون بيانات التعريف لكل المزارع التى فحصتها فى ورق التقرير الخاص .

٤ - افحص مزارع الأطباق للشكل المورفولوجى للفطر النامى . من ملاحظاتك اقترح اسم الجنس للفطر المجهول .

المزارع المقدمة قد تكون لأى جنس من الأجناس الفطرية التالية :

1- Alternaria
2- Aspergillus
3- Cladosporium
4- Cunninghamella
5- Fusarium
6- Geotrichum
7- Gliocladium
8- Mucor
9- Paecilomyces
10- Penicillium
11- Rhizopus
12- Saccharomyces
13- Sporobolomyces
14- Syncephalastrum

أسـئلة QUESTIONS

١ - ما هى المزارع التى تحتوى على أكياس أسبورانجية Sporangia ؟

٢ - لاتوجد جراثيم جنسية فى هذه المزارع . اشرح .

٣ - أى من هذه المزارع يملأ طبق بترى بالميسيليوم ؟

٤ - كيف تستطيع أن تجبر المزارع الثنائية الشكل Dimorphic لتتواجد كخلايا مفردة ، وعديدة الخلايا multicellular ؟

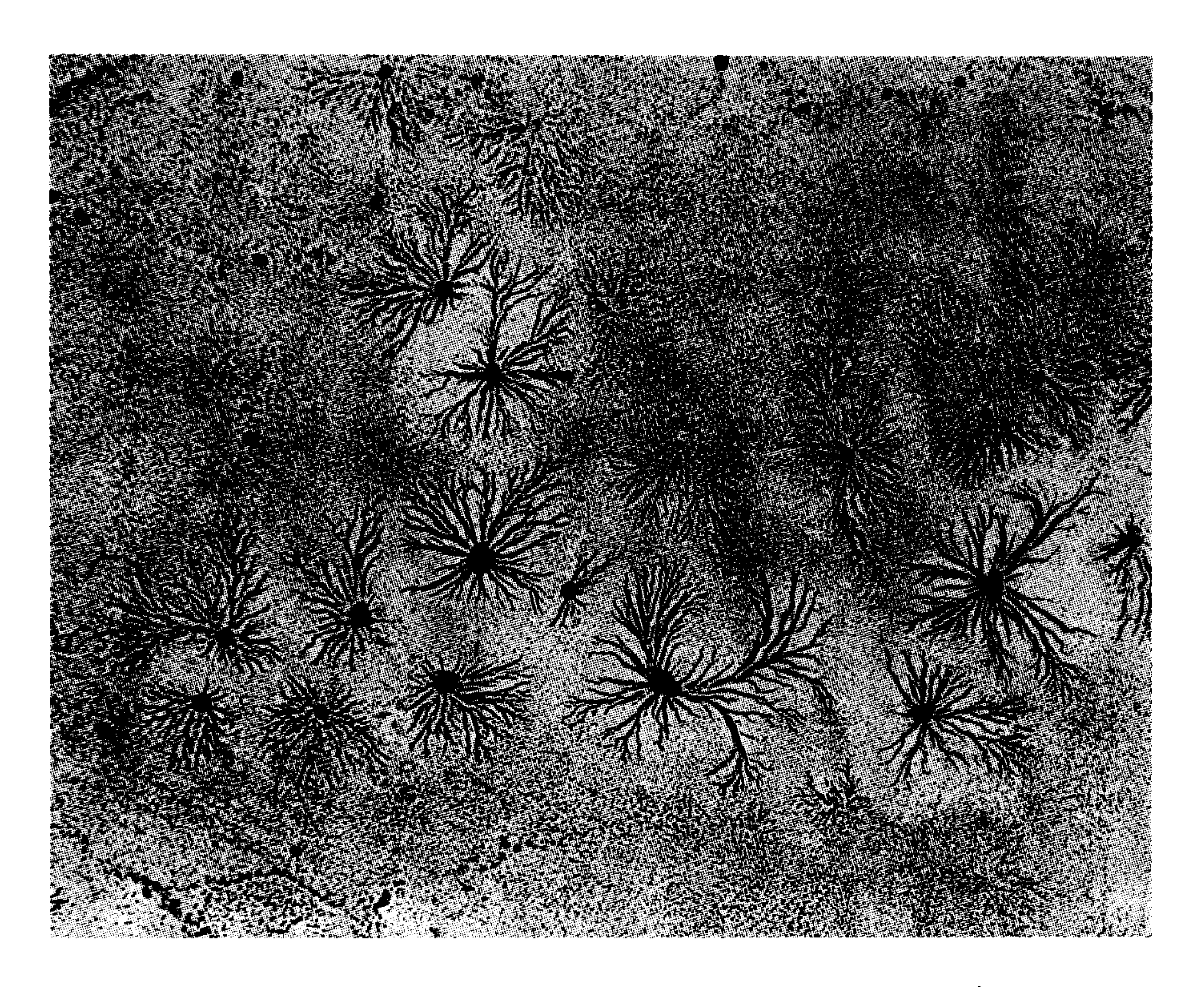
٥ - أى المزارع التى تتكون من خلايا مفردة unicelluar ؟

٦ - لماذا يسمى أحيانًا جنس *Geotrichum* بالفطر الذى يعمل كالماكينة machinery fungus ؟

تدريـب (٦٧)

الفطريات اللزجة الخلوية Cellular Slime Molds

على الرغم من هذه التسمية .. فإن الفطريات اللزجة الخلوية ليست بفطريات حقيقية ؛ ففى مرحلة طورها الخضرى ، فإنها تتشابه كثيرا مع البروتوزوا فى عدم وجود جدار خلو ، وفى الحركة ، وفى طريقة التغذية ، وهى تتشابه مع الفطريات فى أحد أطوار دورة حياتها فقط ، والذى تكوّن فيه أكياسًا أسبورانجية تحمل بداخلها جراثيم ذات جدار خلو .



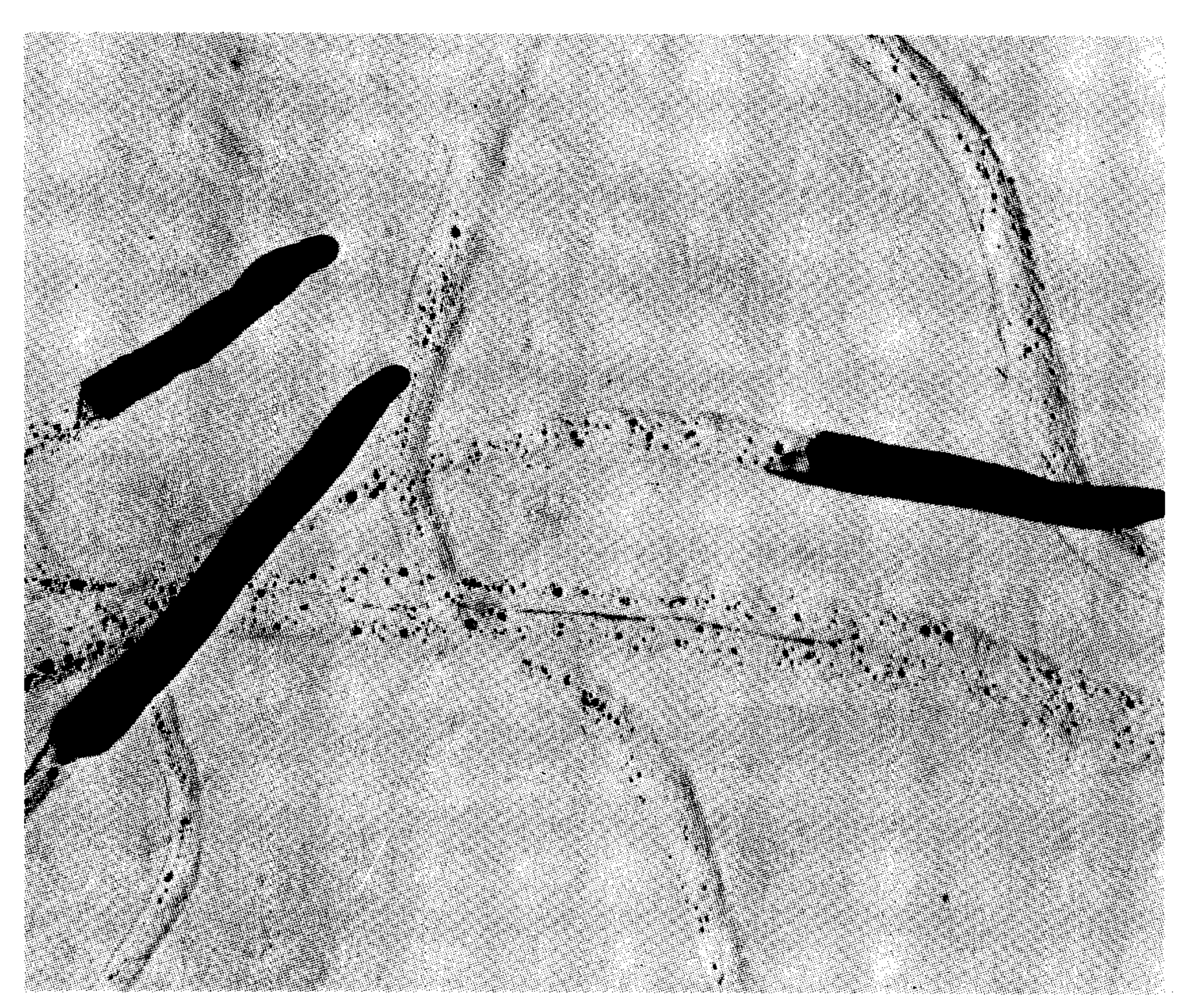
شكل (١) : تجمع الأميبا اللزجة لفطر لزج خلو من **Plants in perspective by E.H. Newcomb, G.C. Gerloff, and W.F. Whittingham. W.H. Freeman and Company. Copyright. © 1964.**

فى هذا التدريب .. سوف تنمى الفطر اللزج الخلوى المسمى *Dictyostelium discoideum* مع بكتيريا *Escherichia coli* كمصدر لغذاء الفطر .

تبدأ دورة حياة هذا الفطر بخروج الجراثيم من الكيس الأسبورانجى وتناثرها . وبامتصاص الماء .. يتشقق جدار الجرثومة وتبرز منه خلية واحدة شبيهة بالأميبا Amoeba-like تسمى بالأميبا اللزجة Myxamoeba . هذه الخلايا متحركة وهى تعيش مستقلة ، وبتغذيتها على البكتيريا فإنها تنمو ، وتتكاثر بالانقسام fission . وبنفاذ المواد المغذية .. فإن هذا الطور حر المعيشة الذى يتغذى ، free-living, feeding stage ، ينتهى وتسبح الأميبا اللزجة إلى مركز تجمع aggregation center (انظر شكل ١) ، حيث تتجمع كتلة رخوة لها شكل السجق sausage-shaped slug تسمى بلازموديوم كاذب Pseudoplasmodium (انظر شكل ٢) .

قد تهاجر هذه الكتلة الرخوة العديدة الخلايا كوحدة - لفترة من الوقت - تاركة خلفها أثرًا لزجاً . عندما تقف الهجرة .. تمر خلايا الكتلة الرخوة بتغيرات عديدة معقدة ، لتكون الكيس الأسبورانجى الذى بداخله الجراثيم .

ومن الناحية المورفولوجية .. فإن خلايا الكتلة الرخوة الموجودة بالمنطقة الأمامية ، أو فى القمة ، تكون تركيبا يشبه الحامل stalk-like structure . أما الخلايا التالية ، أو الموجودة بمؤخرة الكتلة الرخوة .. فإنها تتحرك فوق الحامل ككرة من الخلايا لتكوّن طرف الحامل . عندئذ .. تتحول هذه الخلايا إلى جراثيم ، كل منها قادر على بدء دورة حياة أخرى لهذا الفطر اللزج .



شكل (٢) : هجرة الكتل الرخوة للفطر اللزج الخلوى على سطح الآجار . من Plants in parspective by E.H. Newcomb, G.C. Gerloff, and W.F. Whittingham. W.H. Freeman and Company. Copyright © 1964.

طريقة العمل PROCEDURE

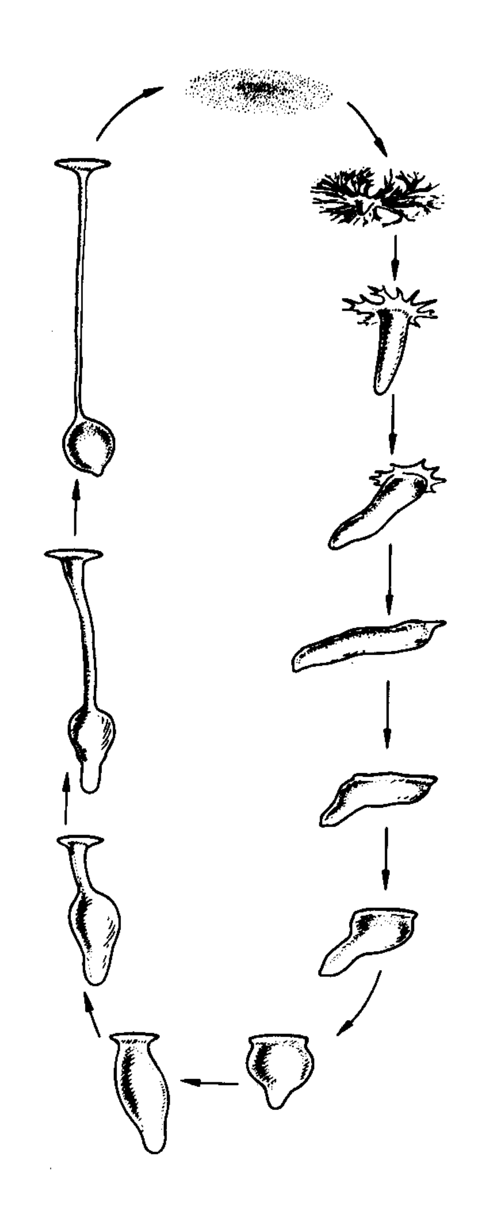
١ – جهز طبق آجار مغذى ، وبالقلم الشمع ارسم على قاع الطبق خطين يكونان زاوية قائمة .

٢ – بغمسة إبرة من *E. coli* خطط سطح الطبق بخطوط تمتد على طول كل من الخطوط المبينة بقاع الطبق .

٣ – لقح غمسة إبرة من فطر *D. discoideum* فى طرف واحد من أطراف كل خط من خطوط البكتيريا . حضن الطبق على حرارة الغرفة لمدة يومين .

٤ – بعد التحضين .. افحص النمو على الطبق بالعين المجردة ، ثم بعدسة يدوية ، أو ميكروسكوب تشريح dissecting microscope . بعدئذ .. ضع الطبق على مسرح الميكروسكوب وافحص بالقوة الصغرى ، ثم بالقوة الكبرى الجافة .

ابحث عن نماذج لكل مراحل النمو الموضحة فى شكل (٣)) وافحص ما تجده .



شكل (٣) : مراحل حياة الفطر اللزج الخلوى . D. discoideum. (From plants in Perspective by E.H. Newcomb, G.C Gerloff, and W.F. Whittingham. W.H. Freeman and Company. Copyright © 1964).

عندما تجد تجمعًا من خلايا الأميبا اللزجة ، فرّق هذا التجمع بالإبرة وافحص الخلايا المكوّنة له . كرر ذلك مع البلازموديوم الكاذب .

إذا لم تشاهد أجسامًا ثمرية Fruiting bodies ، أعد تحضين المزرعة لمدة يومين ، ثم أعد الفحص .

أسئلة

QUESTIONS

١ – ما هو الفرق بين البلازموديوم الكاذب لفطر *D. discoideum* والبلازموديوم *Plasmodia* الذى يكونه العديد من الفطريات اللزجة ؟

٢ – ما هى المادة الكيميائية الجاذبة attractant التى تسبب حدوث التجمع ؟ هل تعمل هذه المادة أيضاً مع أنواع أخرى من الكائنات ؟

الباب الثالث عشر

ميكروبيولوجيا المياه : التطهير ، والتلوث

WATER MICROBIOLOGY: SANITATION AND POLLUTION

بسبب الزيادة المستمرة فى أعداد السكان ، والتطورات التكنولوجية .. فإن موارد المياه الأرضية التى اعتبرت طويلا كمنحة بلا مقابل ، أصبحت مصدرًا ثميناً تجب حمايته والمحافظة عليه . واليوم .. فإنه يجب على كل شخص أن يكون على وعى بالحاجة المتزايدة ، لتوفر مصدر مناسب من المياه النظيفة .

من مظاهر تلوث مصادر المياه : وجود تيفود وبائى epidemic typhoid ، أو ظهور سمك ميت على شواطئ البحيرة . ويحدث التلوث نتيجة لإلقاء المخلفات فى المياه ؛ مما يسبب تغيرات جوهرية وضارة فى أنواع ، وأعداد ونشاط الميكروبات الموجودة بالوسط المائى . وأمثلة تلوث مصادر المياه بالمخلفات البرازية المسببة لانتشار الأمراض ، مثل : الحمى التيفودية typhoid fever ، والدوسنتاريا Dysentry شائعة ، ومعروفة .

والمياه كمصدر للمرض ، لاتمثل إلا جانباً واحدًا من مشاكل تلوث المياه . فعند دخول المخلفات العضوية إلى نهر ، أو بحيرة .. تتعرض للتحلل الميكروبى ؛ مما يؤدى إلى سرعة نفاذ الكميات المحدودة من الأكسجين الموجودة بتلك المياه ، مكونا بذلك وسطا خاليا من كل أنواع الكائنات الحية عدا الأنواع اللاهوائية ، وهو وسط يتميز بما يلى : وجود الأسماك الميتة ، وتدهور الحياة النباتية ، والروائح الكريهة الناتجة من أنشطة الميكروبات اللاهوائية . أما مخلفات الصناعات الكيميائية فإنها لا تتحلل بالميكروبات ، ولكن يحدث تأثيرها المدمر على الأحياء المائية بوسائل أخرى .

ولكى نتمكن من مراقبة الاستخدام السليم للمياه ، فإنه يجب أن تكون لدينا طرق ووسائل للكشف عن التلوث وقياسه . وتقدر جودة المياه بدرجة كبيرة بالتحاليل البكتريولوجية . والهدف الأساسى من هذه التحاليل هو معرفة إذا كانت مصادر المياه تحتوى على ميكروبات برازية fecal organisms (وليس بالضرورة أن تكون مرضية) ، حيث يؤخذ وجود هذه الميكروبات البرازية

كدليل على تلوث المياه بالمخلفات الآدمية أو الحيوانية . وبصفة عامة .. فإن الميكروبات التى يبحث عنها هى بكتيريا القولون Coliform bacteria ، أو مجموعة Coli-aerogenes group ، التى تشمل كل الميكروبات الهوائية والاختيارية ، والتى تتميز بأنها عصويات مستقيمة ، سالبة لجرام ، غير متجرثمة ، تخمر سكر اللاكتوز مع إنتاج غاز .

وبالإضافة إلى ما سبق .. فإن أهمية قياس كمية المواد العضوية الموجودة فى المياه أو المخلفات ، يمكن أن تبنى على الحقيقة بأن الأكسجين المستهلك بواسطة الميكروبات ، يتناسب طرديا مع كمية المادة العضوية الموجودة . وهذا الأساس ، يستخدم عادة فى طريقة تقدير الحاجة البيوكيميائية للأكسجين Biological oxygen demand technique, B.O.D. . هذا الاختبار ، بالاضافة لكونه قياس للمخلفات العضوية الموجودة بالماء ، فإنه يمكن أن يستعمل لتقدير مدى نجاح النظام المستخدم لمعالجة المياه أو مخلفات المجارى ، ويمكن أن يستخدم أيضا ، فى تقدير ما إذا كانت المخلفات المعالجة قد وصلت إلى الدرجة المناسبة ، التى تكفى للتخلص منها بإلقائها فى نهر أو بحيرة ، دون حدوث أضرار لمستوى الأكسجين بالوسط المائى .

تدريـــب (٦٨)

التحليل القياسى للمياه Standard Analysis of Water

التحليل القياسى للمياه للكشف عن وجود بكتيريا القولون ، يتكون من ثلاثة اختبارات : الاحتمالى والتأكيدى والتكميلى . وفى الاختبار الاحتمالى ستبحث عن الميكروبات القادرة على تخمير سكر اللاكتوز مع إنتاج غاز ، والمفترض أنها بكتيريا القولون .

أما فى الاختبار التأكيدى .. ستأخذ عينة من الميكروبات ، التى أعطت نموا وكونت غازا فى بيئة مرق اللاكتوز للاختبار الاحتمالى ، وتنميها فى بيئة انتقائية تفرق مجموعة الكولاى والإيروجينز . فى الاختبار التكميلى .. ستعزل وتنمى فى مزارع نقية ، الميكروبات التى أعطت تفاعلات نموذجية typical reactions لبكتيريا القولون فى الاختبار التأكيدى . هذه المزارع النقية المعزولة ، يجب أن تبين الشكل المورفولوجى والخواص الفسيولوجية لبكتيريا القولون ، بما فى ذلك القدرة على تخمير اللاكتوز مع إنتاج غاز .

هذا النظام المتسلسل فى التحليل ، يوفر طريقة حساسة للكشف عن الميكروبات المتخذة كدليل للتلوث Indicator organisms .

PROCEDURE — طريقة العمل

يمكنك فى هذا التدريب احضار عينة ماء من منزلك ، أو من نهر قريب ، أو بحيرة أو أى مصدر آخر لإجراء جزء من التحليل .

ملحوظة : التفصيلات الكاملة لطريقة التحليل تجدها فى

Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th Ed., 1975, published by the American Public Health Association.

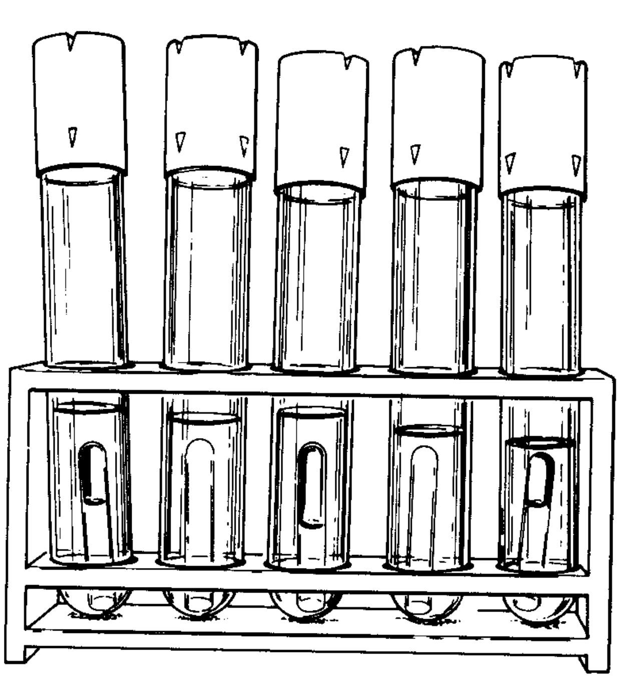
Presumptive Test — الاختبار الاحتمالى

١ – لقح ١٠ مل من عينة الماء ، كل فى ثلاث أنابيب كبيرة بكل منها ١٠ مل مرق اللاكتوز . وتجهز هذه العينة بحيث تحتوى على ضعف التركيز العادى للبيئة Twice-strength ، وذلك حتى يمكن عمل التخفيفات منها . لقح ١,٠ مل ، ٠,١ مل من عينة الماء فى أنابيب صغيرة (لقح مجموعتين ، بكل مجموعة ثلاث أنابيب) تحتوى على التركيب العادى لبيئة مرق اللاكتوز single strength .

٢ – حضن على درجة ٣٧° لمدة يومين .

٣ – افحص بعد ٢٤ ساعة وبعد ٤٨ ساعة .

ووجود غاز فى أى أنبوبة بعد ٢٤ ساعة ، يعنى اختبارا احتماليا موجبا Positive presumptive test (انظر شكل ١) .



شكل (١) : الاختبار الاحتمالى لمجموعة بكتيريا القولون : تبين تكون غاز من مرق اللاكتوز .

أما تكون الغاز خلال فترة الـ ٢٤ ساعة التالية ، يعنى اختباراً مشكوكا فيه doubtful presumtive test .

أما عدم تكون غاز بعد ٤٨ ساعة من التحضين ، يعنى اختبارا سالبا Negative presumtive test ؛ مما يدل على أن عينة الماء لا تحتوى على بكتيريا القولون Coliforms .

الاختبار التأكيدى Confirmed Test

يجرى هذا الاختبار ، لكل العينات التى أعطت فى الاختبار الاحتمالى اختبارات موجبة أو مشكوكا فيها .

١ – من أنبوبة مرق اللاكتوز الموجبة للاختبار الاحتمالى لأقل كمية لقاح من عينة الماء ، خطط طبق بيئة آجار الأيوسين وأزرق الميثلين Eosin-methylene blue agar, EMB ، أو طبق آجار اندو Endo agar(*) ، بطريقة مناسبة لتكوين مستعمرات متباعدة تماما .

٢ – حضن على درجة ٣٧°م لمدة يومين .

إذا تكونت مستعمرات نموذجية Typical colonies (كما هو مشروح فى تدريب ٤٣) على سطح الطبق خلال فترة التحضين ، فإن الاختبار التأكيدى يعتبر موجبا .

الاختبار التكميلى Completed Test

١ – من بيئة آجار الأيوسين وأزرق الميثلين أو من بيئة آجار إندو ، اختر مستعمرتين ، يظهر من شكلهما أنهما من المحتمل جدا أن تكونا لميكروبات مجموعة بكتيريا القولون ، وانقل كل منهما على سطح آجار مائل ، وإلى أنبوبة بيئة مرق تخمر اللاكتوز .

(بكتيريا القولون ، على بيئة EMB وبيئة آجار إندو ، تعطى مستعمرات غامقة غالبا – وليس دائما – وتكون سوداء ذات بريق معدنى مخضر greenish metallic sheen على بيئة EBM ، حمراء ذات بريق معدنى أخضر ذهبى golden green metallic sheen على بيئة آجار إندو .

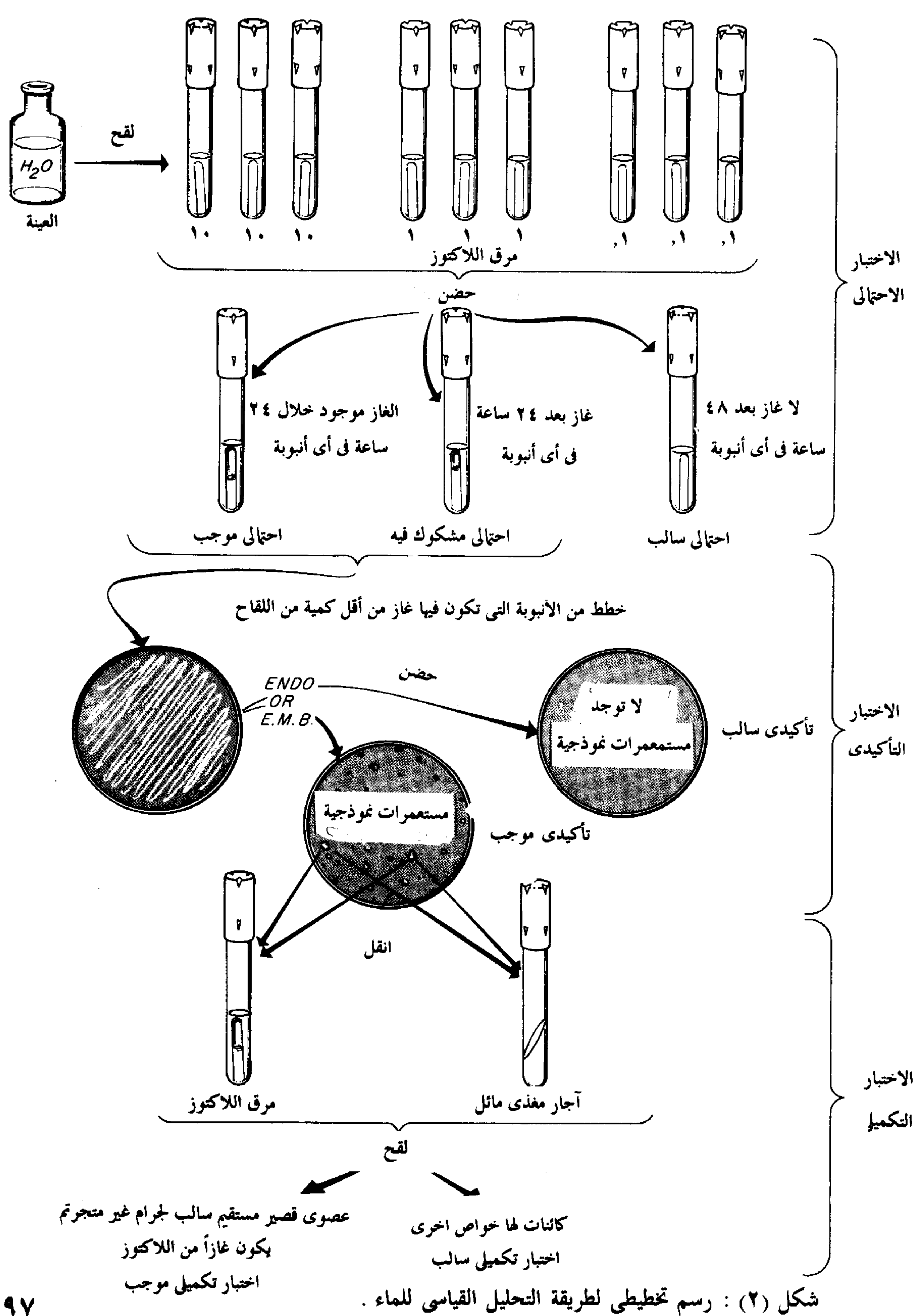
٢ – حضن على درجة ٣٧°م لمدة يومين .

٣ – حضر شرائح من الآجار المائل ، واصبغ بصبغة جرام وبصبغة الجراثيم .

تكون الغاز فى مرق اللاكتوز ، ووجود بكتيريا عصوية سالبة لجرام غير متجرثمة بمزارع الآجار ، يعتبر اختبارا تكميليا مرضيا ، يدل على وجود أفراد مجموعة بكتيريا القولون ، وعلى أن عينة الماء الأصلية ملوثة .

(*) يقترح أن تستعمل المجموعة التبادلية من الطلاب بيئات متبادلة .

(انظر شكل ٢) ، الذى يوضح طريقة التحليل القياسى للمياه برسم تخطيطى)



شكل (٢) : رسم تخطيطى لطريقة التحليل القياسى للماء .

أســـئلة
QUESTIONS

١ – ما هى الميكروبات الأخرى – بخلاف بكتيريا القولون – التى تستطيع أن تعطى اختبارا احتماليا موجبا ؟

٢ – لماذا لا تختبر عينات المياه مباشرة لميكروبات التيفود *Salmonella typhosa* ، والميكروبات المرضية الأخرى ؟

تـدريـــب (٦٩)

طريقة المرشحات الغشائية لتحليل المياه والهواء(*)

Membrane Filter Technique in Water and Air Analysis

تحليل المياه
Water analysis

تستعمل المرشحات الغشائية ، لحجز البكتيريا من الماء ومن المواد الأخرى . تنمى البكتيريا المحجوزة مباشرة على المرشح بوضعه على بيئة مناسبة . ومن خلال استعمال بيئة انتقائية معينة .. فإنه يمكن تقدير أعداد بكتيريا القولون Coliforms وبعض أنواع البكتيريا الأخرى الموجودة بالعينة . تسهِّل هذه الطريقة أيضا ، عملية العزل المباشر لميكروبات معينة مثل السالمونيلا ، حتى إذا تواجدت الميكروبات بأعداد قليلة .

أساسا .. ترشح كمية معلومة الحجم من السائل ، خلال غشاء دقيق حاجز للبكتيريا bacteria-retaining ، سعة ثقوبه حوالى ٠,٤٥ ميكرومتر ، فيحجز البكتيريا على سطحه . بعد ذلك ينقل الغشاء ويوضع على سطح وسادة رفيعة ماصة thin absorbent pad سبق تشبيعها بالبيئة المناسبة للنمو ، أو بالبيئة المناسبة للتفرقة بين الميكروبات الجارى دراستها ، مثل بيئة إندو المعدلة Modified Endo medium, M-Endo للعد الكلى لبكتيريا القولون . ويمكن انتقاء البكتيريا السبحية البرازية Fecal streptococci ، باستعمال بيئة آجار انتروكوكس المعدلة Modified enterococcus-agar medium, KF agar ، المحتوية على الأزايد Azide ، وكذلك يمكن انتقاء بكتيريا القولون البرازية Fecal coliforms ،

(*) الأدوات والأجهزة الخاصة بفحص الماء والهواء بطريقة المرشحات الغشائية من السهل الحصول عليها من
Millipore Corp., Bedford, MA 01730

وللحصول على معلومات أدق عن طريقة الاستعمال فيمكن الرجوع إلى :

1) Millipore Corp., publications numbered LAM 3020 /u and LAP 3090 /u.

2) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th Ed., 1975, published by the American Public Health Association.

باستعمال بيئة بكتيريا القولون البرازية المعدلة Modified fecal coliform medium, M-FC broth ، مع التحضين على درجة ٤٤,٥° م فى طبق بترى صغير . بعد التحضين .. تعد المستعمرات تحت القوة الصغرى للميكروسكوب .

يعتمد نجاح طريقة المرشحات الغشائية ، على استعمال بيئات مناسبة انتقائية أو تفريقية ، تسمح بسهولة تعريف المستعمرات المتكونة .

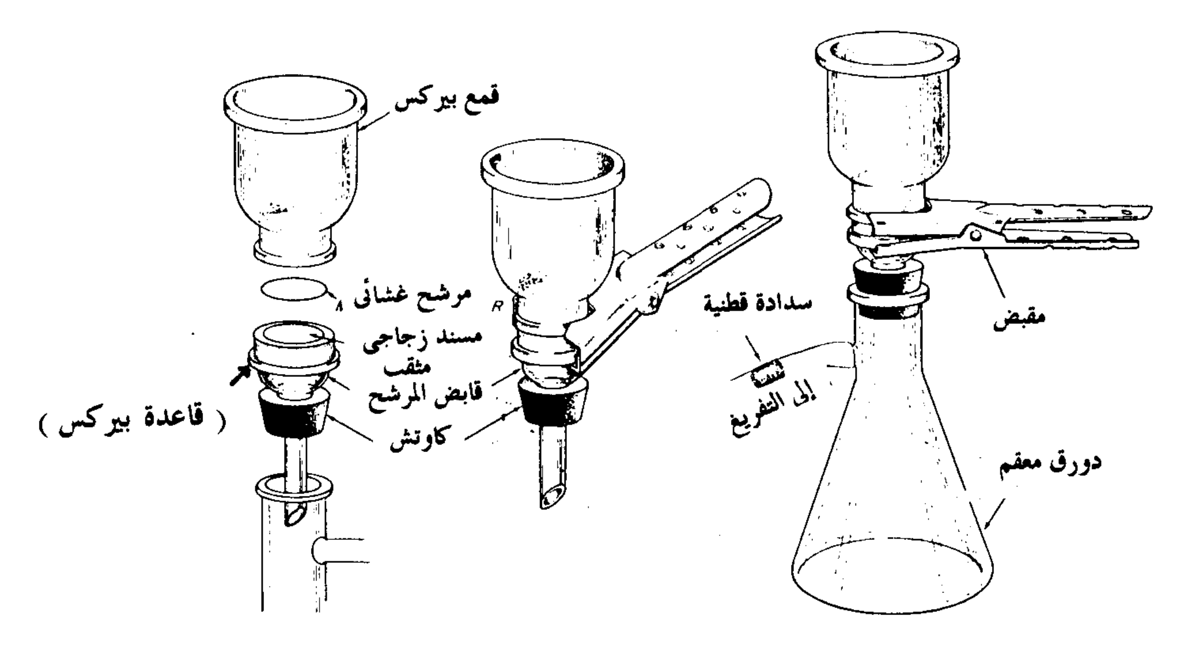
لهذه الطريقة مميزات عن الطرق التقليدية المستخدمة لتحليل المياه (المذكورة فى تدريب ٦٨) ؛ إذ إنها طريقة مباشرة بدرجة أكبر وأسرع (تعطى نتائج خلال ١٨ - ٢٤ ساعة) ، كما يمكن بواسطتها فحص كميات كبيرة من عينات الماء بسهولة ، وبالتالى فإنها تعطى نتائج أكثر تمثيلا .

وتتميز ميكروبات الدليل Indicator organisms ، المستخدمة للحكم على جودة المياه وهى مجموعة بكتيريا القولون ، بقدرتها على تحليل سكر اللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز . يوجد بعض من بكتيريا القولون فى مصادر غير برازية .

ويتخذ وجود مجموعة بكتيريا القولون البرازية Fecal coliforms, FC فى المياه ، دليلا على وجود مخلفات برازية حديثة ، مصدرها الحيوانات ذوات الدم الحار . وتعرف مجموعة بكتيريا القولون البرازية FC ، بقدتها على تخمير اللاكتوز عند درجة ٤٤,٥° م مع إنتاج حامض وغاز . النموذج المثالى لهذه المجموعة هى بكتيريا *Escherichia coli* ذات اختبارات IMVIC tests (+ + - -) (اختبارات الإندول ، أحمر الميثايل ، فوجز بروسكاور ، السترات) ، وكذلك بكتيريا *Aerobacter aerogenes* ذات الاختبارات (- - + +) ، مع وجود بعض الأنواع الوسيطة . توجد البكتيريا السبحية البرازية Fecal streptococci, FS فى أمعاء الحيوانات بأعداد أكبر عن أمعاء الانسان ، واستعمال نسبة FC / FS ratio (أى العلاقة النسبية لكل مجموعة) ، هام فى تقدير احتمال كون التلوث البرازى من مصدر حيوانى ، أو من مصدر آدمى .

ويجب أن تكون بكتيريا الدليل النموذجية ، قابلة التطبيق للكشف عن التلوث فى مختلف أنواع المياه ؛ فهذه الأدلة يجب أن تكون موجودة دائما فى المياه مادامت البكتيريا المرضية موجودة ، وبأعداد ترتبط مباشرة بدرجة التلوث ، ويجب أن تكون قادرة على البقاء حية فى الماء لمدة أطول عن الميكروبات المرضية ، وأن تختفى بسرعة بعد اختفاء الميكروبات المرضية ، وأن تكون المياه السليمة خالية منها ، كما يجب أن يكون تقديرها الكمى سهلا دون تداخل مع البكتيريا الأخرى ، وأن تكون غير ضارة للفنيين القائمين بالعمل .

تفى بكتيريا القولون بأغلب هذه الاحتياجات ، باستثناء أن بعضا منها لا يختفى بعد موت الميكروبات المرضية .



شكل (١) : جهاز المرشح الغشائى .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – ضع قابض المرشح في سدادة الكاوتش ، ثم أدخله فى زجاجة التفريغ المتصلة بمضخة التفريغ (انظر شكل ١) .

٢ – باستعمال ملقط معقم ، انقل المرشح الغشائى إلى منصة قاعدة وحدة المرشح ، على أن يكون سطح المرشح المسطر لأعلى .

٣ – ضع وحدة القمع المناسبة على قرص الترشيح ، تأكد من أن القمع ممسوك بأحكام فى مكانه ، بواسطة المقابض التى من نوع المقص scissors-type clamp .

٤ – جهز ثلاث أطباق بترى صغيرة مرقمة بأحجام العينات الثلاث التى ستستعمل .

٥ – صب حوالى ٢٠ مل ماء منظم الحموضة buffered water معقم فى القمع ، وذلك قبل إضافة العينة .

٦ – رج زجاجة العينة جيدا .

٧ – باستعمال ماصة ١٠ مل أو مخبار مدرج ، خذ حجما معلوما من العينة ، وضعه فى قمع المرشح .

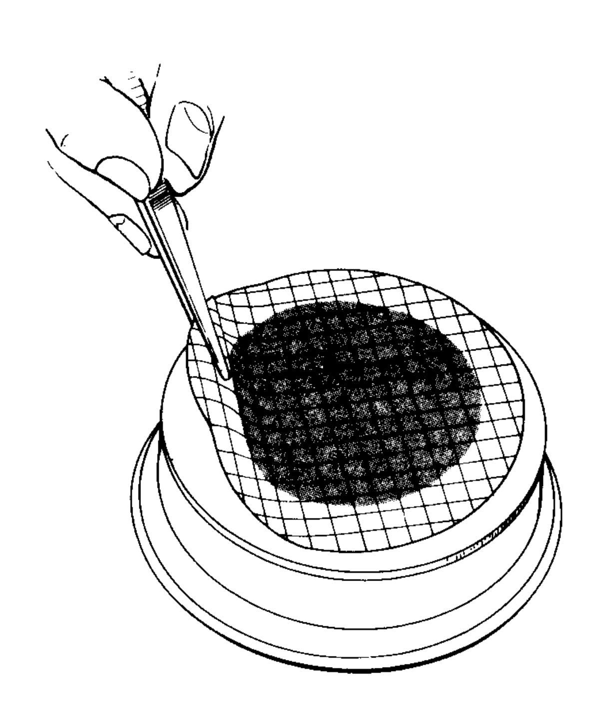
٨ – ضف كمية من ماء منظم الحموضة معقم تعادل حجم العينة ، إلى القمع ، وكرر ذلك لمرتين ، وذلك لغسل الخلايا من آثار الوعاء الذى استعمل فى القياس .

٩ - شغل مضخة التفريغ ليمر السائل خلال المرشح إلى الزجاجة .

١٠ - أثناء التفريغ .. اغسل القمع بكمية من ماء منظم الحموضة معقم ، تعادل كمية السائل الذى تم ترشيحه . صب ماء الغسيل هذا على جدران القمع فى حركة دائرية ، لغسل كل جدران القمع .

١١ - بعد مرور ماء الغسيل بالكامل خلال المرشح .. كرر الغسيل مرة ثانية ، ثم استمر فى التفريغ لمدة دقيقة أو حتى جفاف المرشح .

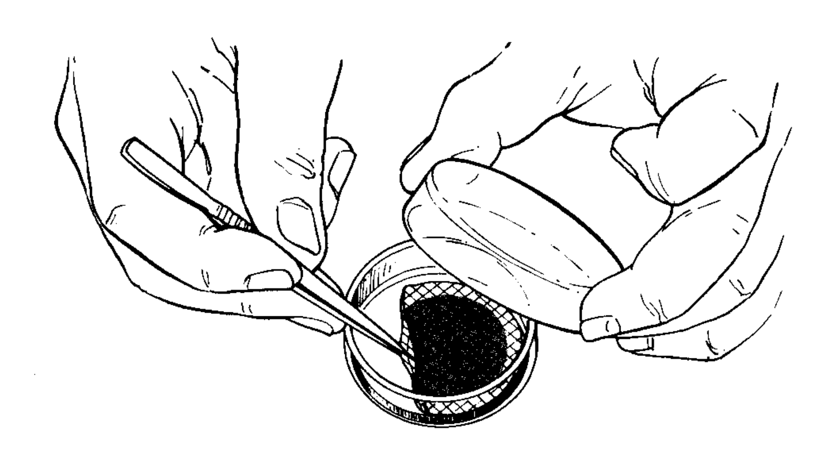
١٢ - اوقف التفريغ ، ثم انقل المرشح الغشائى بملقط معقم باللهب ، إلى البيئة المناسبة بطبق بترى صغير (انظر شكل ٢) .



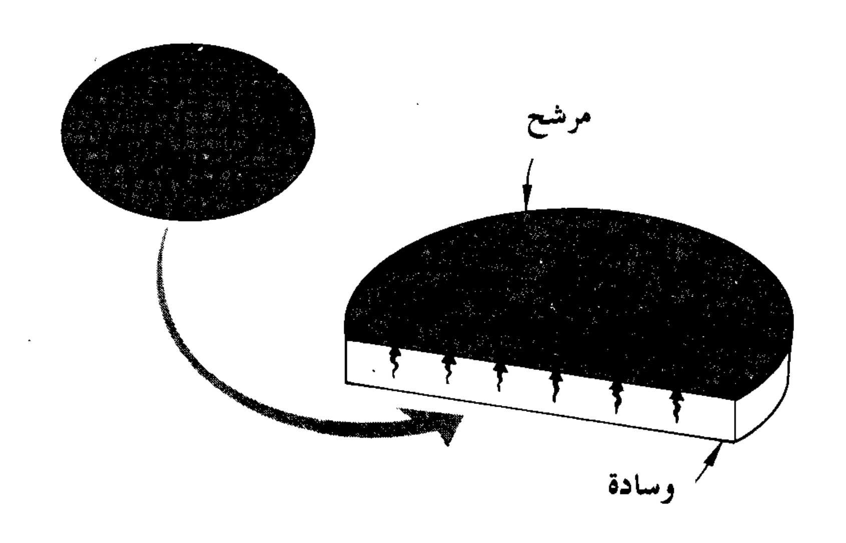
شكل (٢) : إزالة المرشح من جهاز الترشيح .

١٣ - ادفع الغشاء على البيئة بادئا بالجانب البعيد من الطبق ، مع لف الغشاء على البيئة لتجنب حجز فقاقيع هواء تحت الغشاء (انظر شكل ٣) .

١٤ - اكمل بنفس الطريقة للعينات الأخرى . حضن على درجة الحرارة والوقت المناسب (انظر شكل ٤) .



شكل (٣) : وضع المرشح على الوسادة فى طبق بترى .



شكل (٤) : انتشار سائل المرق من الوسادة إلى المرشح لتدعيم النمو .

١٥ – احسب عدد الميكروبات الموجودة فى ١٠٠ مل عينة ، مستعملا المعادلة التالية :

عدد ميكروبات الدليل بكل ١٠٠ مل عينة

$$= \frac{\text{العدد الكلي للمستعمرات}}{\text{حجم العينة المختبرة بالملليلتر}} \times ١٠٠$$

اختبار مجموعة بكتيريا القولون الكلى — Total Coliform Test

١ – تحت شروط التعقيم .. ضع وسادة ماصة معقمة sterile absorbent pad فى كل طبق من أطباق بترى الثلاثة .

٢ – باستعمال ماصة ١٠ مل .. ضف ١,٨ – ٢,٠ مل ، من بيئة مرق إندو المعدلة M-Endo broth ، إلى سطح كل وسادة بالطبق .

٣ – استعمل من العينة أحجام ١ ، ٤ ، ١٥ مل ، ثم ضع علامات لهذه الأحجام على الأطباق ، ثم استمر فى العمل كما هو موضح أعلاه بطريقة العمل .

٤ – حضن الأطباق التى أعددتها مقلوبة على درجة ٣٧° م لمدة ٢٢ – ٢٤ ساعة .

٥ – افحص الأطباق ، وعد المستعمرات ذات اللون الوردى إلى الأحمر الغامق ، والتى لها لمعان معدنى أخضر ذهبى golden green metallic sheen .

يكون العد بالأطباق التى تحتوى على ٢٠ – ٨٠ مستعمرة ، على ألايزيد العدد بالطبق عن ٢٠٠ لكل أنواع المستعمرات .

اختبار مجموعة بكتيريا القولون البرازية — Fecal Coliform Test

١ – أدخل تحت ظروف التعقيم ، وسادة ماصة مقعمة فى كل من غطاء الثلاث أطباق بترى المحكمة الغطاء ، ذات الحافة البارزة ، والتى يمكن فتحها بإدخال ملقط بين الغطاء وقاع الطبق ، مع إدارة الملقط فى حركة دائرية .

٢ – باستعمال ماصة سعة ١٠ مل .. ضف ١,٨ – ٢,٠ مل من بيئة مرق بكتيريا القولون البرازية المعدلة M-FC broth على سطح كل وسادة بالطبق .

٣ – ضف عينات أحجامها ١ ، ٣ ، ١٠ مل للأطباق . واكتب على الأطباق البيانات الخاصة بأحجام العينات المستخدمة بكل طبق ، ثم استمر فى الخطوات كما هو موضح بطريقة العمل أعلاه .

٤ – قم بتغطية الأطباق بإحكام . الصق الغطاء مع قاع الطبق بلف شريط غير منفذ للماء . ضع الأطباق فى وعاء محكم قابل للدوران whirlpac bag . حضن الوعاء فى حمام مائى على درجة ٤٤,٥° م لمدة ٢٢ ساعة . تأكد من أن وعاء الأطباق مغمور كله تحت سطح الماء أثناء التحضين .

٥ – عد المستعمرات ذات اللون الأزرق ، والتى لها مميزات بكتيريا القولون . استخدم فى العد الأطباق التى تحتوى ما بين ٢٠ – ٦٠ مستعمرة .

اختبار البكتيريا السبحية Fecal Streptococcus Test

١ – جهز ثلاث أطباق بترى صغيرة تحتوى على بيئة آجار KF .

٢ – استعمل من العينة أحجام ١ ، ٥ ، ٢٥ مل ، وضع علامات لهذه الأحجام على الأطباق ، ثم استمر فى العمل كما هو موضح فى طريقة العمل .

٣ – حضن الأطباق التى أعددتها على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٤ – افحص الأطباق للمستعمرات المسطحة ذات اللون الأحمر الفاتح ، وكذلك المستعمرات الناعمة ذات اللون الأحمر الغامق وحواف حمراء اللون . إجر العد بالأطباق التى تحتوى على ٢٠ – ١٠٠ مستعمرة .

من المعلومات التى تحصلت عليها آنت وزملاؤك ، والخاصة بِعَدّ بكتيريا القولون البرازية والبكتيريا السبحية البرازية ، احسب النسبة FC/ FS ratio .

$$\frac{\text{عدد بكتيرا القولون البرازية / مل FC/ml}}{\text{عدد البكتيريا السبحية البرازية / مل FS/ml}}$$

إذا كانت نسبة FC/FS أكبر من ٤,٠ ، كان ذلك دليلا قويا على حدوث تلوث مصدره المخلفات الآدمية .

إذا كانت نسبة FC/FS أقل من ٠,٧ ، دل ذلك على أن التلوث مصدره الأساسى (أو بالكامل) من مخلفات حيوانية أو مخلفات دواجن .

إذا تراوحت النسبة ما بين ٢ إلى ٤ ، دل ذلك على سيادة المخلفات الآدمية فى التلوث الخليط .

إذا كانت النسبة ١ أو ٢ فإنه من الصعب تفسير النتائج ، ومن ثم فإنه يقترح بأن تؤخذ عينة للتحليل من أقرب مكان لمصدر التلوث .

تحليل الهواء Air Analysis

ينتشر الكثير من الميكروبات إلى أوساط جديدة بواسطة تيارات الهواء ، ومع ذلك .. فإن الميكروبات الهامة من الناحية المرضية ، لا تمثل إلا جزءا صغيرا من مجموعة الميكروبات المحمولة بالهواء air-borne load .

ويُسبِّب انتشار الميكروبات وبقائها حية بجو المستشفى ، ما يسمى بعدوى المستشفيات (Hospital - acquired infections, nosocomial) .

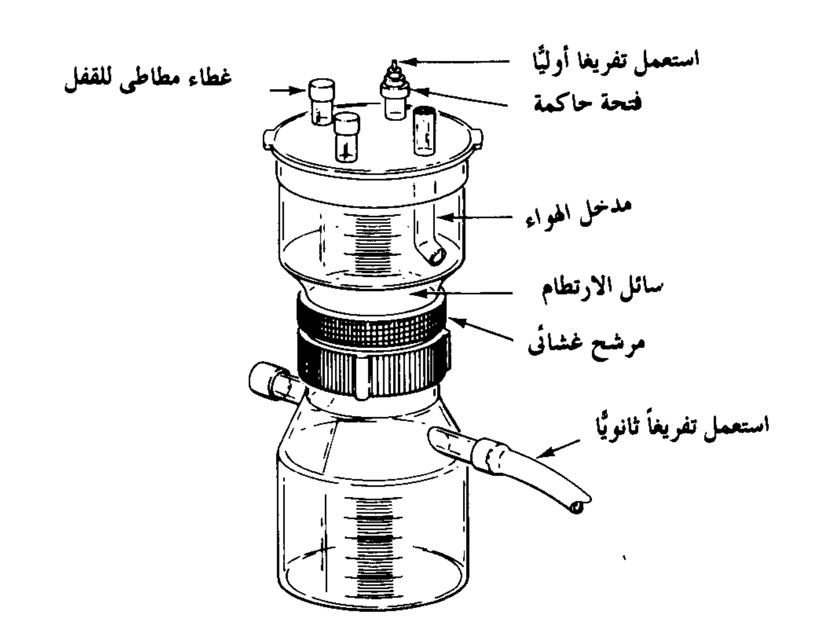
وتحتوى قطيرات الرذاذ المنتشرة بالهواء من السعال Cough أو العطس sneeze ، على الملايين من الأحياء الدقيقة ، وهى مصدر معروف جيدا للميكروبات بالهواء . ومع ذلك .. فإن الجلد والشعر والملابس وملاءات الأسرة والمكانس القش وممسحة الأرضيات ، تضيف الكثير أيضا إلى مجموعة الميكروبات المحمولة بالهواء .

ولبعض الميكروبات الموجودة بالهواء صفات خاصة تسمح لها بالبقاء حية بالهواء ، ولكن الكثير يقف عن نشاطه التمثيلى العادى حتى يسقط ثانية فى وسط مناسب . لذلك .. فإنه من الأهمية بمكان أخذ عينات من الهواء لمعرفة ما يحمله من ميكروبات .

يستعمل جهاز أخذ عينات الهواء (جهاز الارتطام impinger) مع مرشح غشائى ، وبذلك يعمل على تجميع الميكروبات ، وعلى تنميتها كمستعمرات بعد وضعها على البيئة المناسبة .

فعندما يمر تيار الهواء بالجهاز .. ترسب الميكروبات فى سائل مرق خاص فوق سطح المرشح الغشائى . بعد ذلك .. يوقف تدفق الهواء ، ويرشح سائل المرق بالكامل خلال الغشاء ، ثم يرفع الغشاء ، ويوضع على البيئة المناسبة ويحضن . ولاستكمال التقديرات الكمية .. فإن تيار الهواء المأخوذة منه العينة ، يمر من فتحة حاكمة تسمح بمرور ١٠ لترات من الهواء فى الدقيقة ، وذلك لقياس حجمه .

فى هذا التدريب .. ستقارن الميكروبات المحمولة بالهواء خلال الدرس العملى ، مع عينة مأخوذة قبل بدء الدرس بمعرفة مشرف العملى .



شكل (٥) : جهاز Sterifil لأخذ عينات الهواء .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – ضع جهاز Sterifil فى المنطقة التى تريد أخذ العينات منها (انظر شكل ٥) . صل الجهاز بمضخة التفريغ .

٢ – شغل مضخة التفريغ . سيسبب التفريغ تيارا من الهواء يسحب عينة الهواء إلى أسفل ؛ فترتطم بسطح سائل المرق (سائل الارتطام impingement fluid) الموجود فوق المرشح الغشائى .

ويجب أن يكون حجم الهواء المار من خلال الفتحة الحاكمة Limiting orifice ، بكمية كبيرة تكفى لقياس حجمه ، ولإعطاء عينة ممثلة . عموما .. فإن عينة حجمها ٢٨٠ لتر (١٠ قدم[٣]) ، تعتبر كافية بالنسبة لمعظم العينات المأخوذة من داخل المبنى . وحيث إن العينة المناسبة هى ٢٨٠ لتر ، فإنه مع استعمال فتحة orifice تسمح بمرور ١٠ لترات هواء فى الدقيقة ، يكون الزمن الأمثل لأخذ العينة هو ٢٨ دقيقة . استعمل ساعة توقيت stopwatch لمعرفة زمن أخذ العينة .

٣ – أثناء جمع العينة بالجهاز .. جهز طبقين بترى . ضع وسادة ماصة معقمة فى قاع كل طبق ، وشبع الوسادة بـ ١,٨ – ٢ مل من بيئة المرق أ أو ب المناسبة .

طبق بيئة أ : للعد الكلى للميكروبات مع دليل .

وهذه البيئة غير انتقائية ، وتوجد فى أمبولات سعة ٢ مل ، وتستعمل لتنمية مجموعة كبيرة متنوعة من الميكروبات المحمولة بالهواء .

طبق بيئة ب : لعد الخمائر والفطريات .

هذه البيئة انتقائية مضبوطة على pH من ٤ إلى ٥ ، لتثبيط نمو الميكروبات الأخرى مثل البكتيريا .

٤ – بعد انتهاء فترة أخذ العينة ، أوقف مضخة التفريغ .

٥ – افصل منظم الأيروسول Aerosol adapter ، ارفع غطاء القمع ، وباستعمال زجاجة بخ squirt bottle بها ماء معقم .. اغسل الجوانب الداخلية لقمع جهاز ستيريفيل .

٦ – ارفع منظم الأيروسول ، وصل أنبوبة التفريغ بالذراع الجانبية الطويلة لزجاجة الاستقبال receiver flask الخاصة بجهاز ستيريفيل . ضع كاوتش لاصقاً على فتحة الذراع الجانبى الآخر .

٧ – شغل مضخة التفريغ ، وسيسبب هذا سحب الغطاء المطاطى لمخرج القمع إلى زجاجة الاستقبال مع سائل المرق ، وبذلك فإنه لاحاجة لفك الجهاز لرفع غطاء مخرج القمع .

٨ – أوقف مضخة التفريغ ، واغسل جوانب القمع الداخلية ثانية كما ذكر فى الخطوة رقم ٥ . شغل مضخة التفريغ ثانية لسحب كل ماء الغسيل من خلال المرشح .

٩ – أوقف التفريغ ، فك الجهاز وضعه برفق على جانبه .

١٠ – عقم طرف الملقط بالكحول والحرق فى اللهب ، اتركه ليبرد ، وبرفق ارفع المرشح الغشائى من على قاعدة قابض المرشح .

١١ – المس الحافة البعيدة للمرشح ، بالحافة البعيدة للوسادة التى فى طبق البترى . اسقط المرشح تدريجيا ، وبرفق على سطح الوسادة متجنبا حجز فقاقيع هواء بأسفل المرشح .

١٢ – الصق نصفى طبق البترى معا بإحكام . اقلب وضع الوسادة والمرشح من أعلى لأسفل ، وضع المزرعة فى محضن على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة .

١٣ – بعد انتهاء فترة التحضين .. عد مستعمرات البكتيريا والخمائر والفطريات . احسب عدد هذه الميكروبات فى عينة الهواء مستعملا المعادلات الآتية :

(أ) عدد لترات العينة = زمن أخذ العينة بالدقيقة × سعة الفتحة الحاكمة (لتر / دقيقة) .

(ب) حجم العينة بالقدم مكعب = $\frac{\text{عدد لترات العينة}}{٢٨}$

(جـ) عدد الميكروبات فى قدم مكعب هواء

$$= \frac{\text{عدد المستعمرات التى تكونت}}{\text{حجم العينة بالقدم المكعب}}$$

عمل سجلات مستديمة Making Permanent Records

فى بعض الحالات .. قد ترغب فى حفظ نتائج فحص عينات الهواء ، وذلك لاستخدامها كمرجع فى المستقبل أو لإرفاقها بتقرير . وخطوات طريقة الحفظ كالآتى :

١ – باستعمال ملقط ، ارفع بعناية المرشح الخاص بالعينة من طبق البترى ، وضعه على ورق نشاف جاف لمدة لاتقل عن ٣٠ – ٤٥ دقيقة حتى الجفاف .

٢ – يمكن الآن حفظ المرشح الجاف وإرفاقه بأى تقرير بشكل مستديم ، باستعمال قطعة ٨ × ٨ سم من شريط لاصق شفاف .

QUESTIONS

أسـئلة

١ – ما هى الاستعمالات الأخرى لطريقة المرشح الغشائى ؟

٢ – ما هو الهدف من التحضين المسبق Preincubation للمرشح الغشائى فى بيئة الإكثار عند إجراء تحليل المياه ؟

الباب الرابع عشر

ميكروبيولوجيا الأغذية

FOOD MICROBIOLOGY

الأغذية – مثل الماء وأوانى الأكل – يمكن أن تكون مصادر للأمراض التى تسببها الميكروبات . وأيضاً .. فإن نمو الكائنات الدقيقة بالغذاء يمكن أن تحدث به تغيرات ، إما غير مرغوبة مثل الفساد ، أو مفيدة بإنتاج غذاء محفوظ بطريقة أكثر سهولة ، أو غذاء ذى نكهة وطعم أكثر قابلية .

ورغم أن مجال ميكروبيولوجيا الأغذية واسع ، إلا أن المبادئ المستعملة هى تطبيقات عملية لأساسيات علم الميكروبيولوجى التى سبق شرحها فى فصول سابقة من هذا الكتاب . فعلى سبيل المثال .. يتضمن حفظ الأغذية منع التلوث Asepsis لإبعاد الميكروبات ، وأيضا استعمال ظروف بيئية قاسية كالحموضة والحرارة لتثبيط أو قتل الكائنات الدقيقة بالأغذية . ويتشابه الفساد الميكروبى للغذاء مع البيئة الإنتقائية وبيئة الإكثار ، حيث إن التركيب الكيميائى والرقم الإيدروجينى للغذاء ، يحددان – فى الأساس – نوع الفساد .

وتوضح تدريبات هذا الباب ، الطرق المستعملة لتقدير عدد وأنواع الكائنات الدقيقة ، الموجودة فى أنواع عديدة من الأغذية .

تدريب (٧٠)

التقديرات الكمية للبكتيريا فى اللبن الحليب : الخام والمبستر

Quantitative Examination of Bacteria in Raw and Pasteurized Milk

بسبب سرعة تعرض اللبن للفساد ولكونه أيضا مصدرا للأمراض .. فإن محتوى اللبن من البكتيريا يعتبر ذا أهمية قصوى لتقدير جودته .

وتقضى المعاملة الحرارية التى تعرف باسم البسترة Pasteurization على كل الميكروبات المرضية باللبن دون تعقيمه الكامل . وإذا أجريت عملية البسترة بكفاءة .. فإن وجود بكتيريا القولون ، التى

توجد دائما فى اللبن الخام (الحليب) ولكنها تموت بالبسترة ، تعتبر دليلا على حدوث تلوث للبن عقب بسترته .

وتوجد طريقتان ، ولكل محاسنها وعيوبها ، تستعملان لتقدير عدد البكتيريا باللبن . طريقة أطباق الآجار Agar-plate method ، وهى طريقة أكثر حساسية لتقدير أعداد البكتيريا ، كما أنها تعطى نتائج أكثر دقة فى حالة اللبن الملوث بأعداد قليلة من البكتيريا . وتناسب طريقة العد الميكروسكوبى المباشر Direct microscopic count ، بدرجة أكبر اللبن المحتوى على أعداد كبيرة من البكتيريا . وكلا الطريقتين تعطيان فكرة عن الظروف التى أحاطت بعملية تجميع اللبن وتداوله وتخزينه ، وهى معلومات لها أهميتها الكبيرة المتعلقة بالنواحى الصحية .

يعتبر الزرع المباشر على أطباق آجار ديزوكسى كولات Desoxycholate agar ، عملية انتقائية وأيضا تفريقية لبكتيريا القولون فى اللبن ؛ فهذه البيئة تثبط نمو معظم أنواع البكتيريا عدا بكتيريا القولون والأنواع المنتمية لها . وتظهر بكتيريا القولون المخمرة لسكر اللاكتوز كمستعمرات حمراء اللون من السهل تمييزها وعدها . أما الأنواع غير المخمرة للاكتوز .. فإنها تظهر كمستعمرات بيضاء اللون .

وسنستخدم فى هذا التدريب .. طريقة العد بالأطباق (المشروحة فى تدريب ١٥) ، لتقدير أعداد بكتيريا القولون وأعداد البكتيريا الأخرى فى اللبن الخام (الحليب) وفى اللبن المبستر . وسيستدل على كفاءة عملية البسترة من انخفاض العدد الكلى للبكتيريا وأيضا اختفاء كل بكتيريا القولون .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – من عينة اللبن الحليب المعطاة لك .. جهز تخفيفات $١٠^{-١}$ ، $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ ، $١٠^{-٤}$.

بطريقة العد بالأطباق .. ازرع تخفيفات $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ ، $١٠^{-٤}$ من عينة اللبن الحليب على أطباق بيئة آجار العد القياسية Standard-plate-count agar ، ومن تخفيفات $١٠^{-١}$ ، $١٠^{-٢}$ على آجار ديزوكسى كولات .

ملاحظة

بعد تصلب بيئة آجار ديزوكسى كولات .. صب طبقة رفيعة من الآجار على السطح لمنع نمو مستعمرات سطحية ، والتى قد تعطى تفاعلات غير نموذجية atypical reactions .

٢ – بستر اللبن بالتسخين فى حمام مائى على درجة ٦١,٧° م لمدة ٣٠ دقيقة . تأكد من ضبط

درجة الحرارة طوال المدة المحددة للبسترة ، ومن أن مستوى سطح ماء الحمام أعلى من مستوى سطح اللبن .

٣ - ازرع تخفيفات ١٠^-٢ ، ١٠^-٣ من اللبن المبستر على آجار أطباق العد القياسية ، وواحد مل ، ومن تخفيف ١٠^-١ على آجار ديزوكسى كولات .

٤ - حضن جميع الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة ، وعد المستعمرات النامية الناتجة عن اللبن الحليب واللبن المبستر على نوعى الآجار .

أسـئلة QUESTIONS

١ - لماذا تُحز etched مساحة الـ ١ سم^٢ بداخل الزجاج الخاص بطبق العد على جهاز عد المستعمرات ؟

كم عدد السنتيمترات المربعة التى توجد فى مساحة سطح طبق بترى قطره ١٠٠ مم ؟

٢ - ما هى الميكروبات المرضية التى يمكن أن تتواجد فى اللبن الحليب ؟

٣ - ما هى الميكروبات التى تستخدم كمرجع لتحديد درجة الحرارة والمدة اللازمة لعملية البسترة ؟

تـدريـــب (٧١)

العد الميكروسكوبى المباشر للبكتيريا فى اللبن الحليب

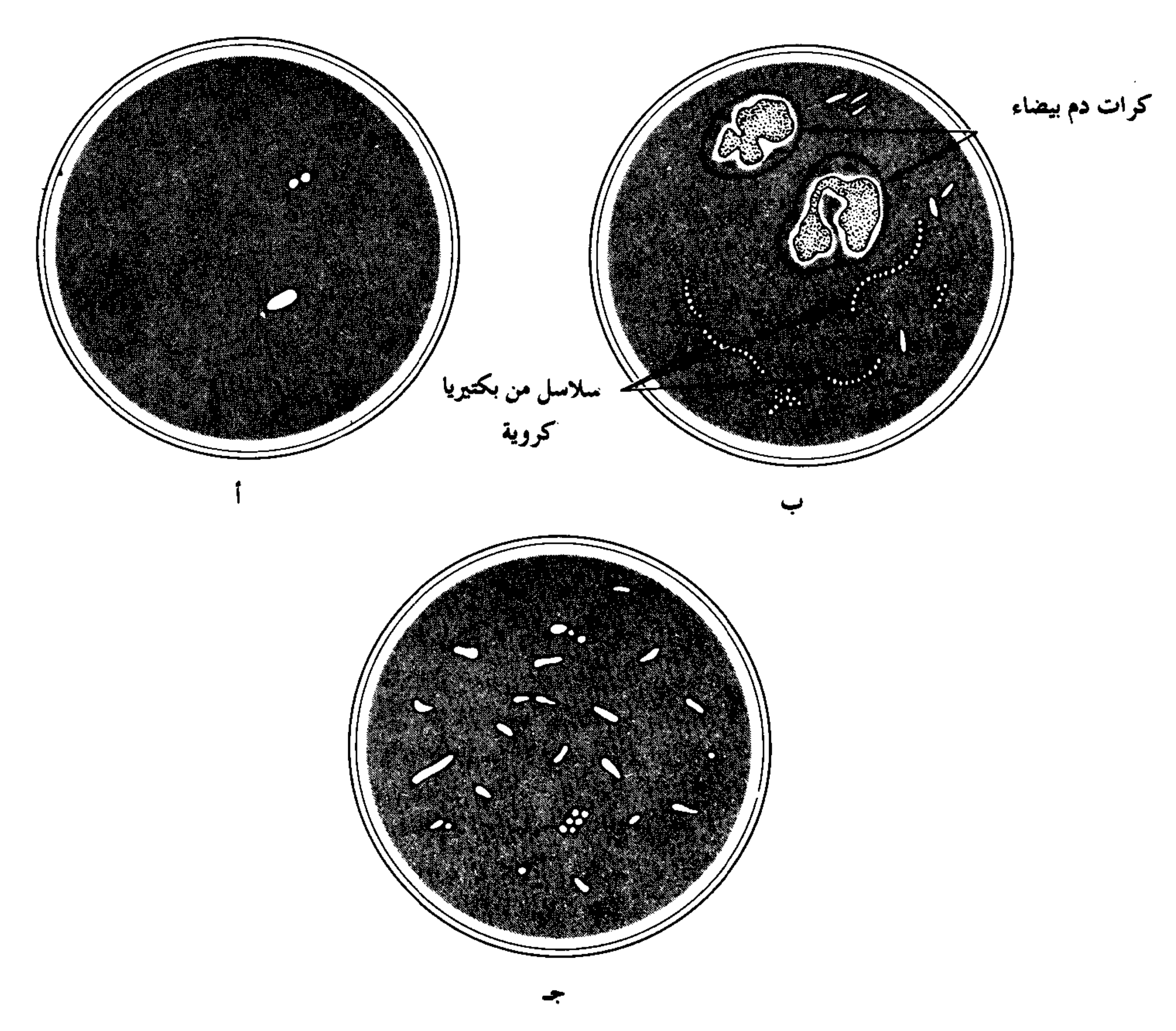
Direct Microscopic Determination of Bacteria in Milk

لتقدير أعداد البكتيريا فى اللبن الحليب بالطريقة الميكروسكوبية المباشرة .. ينشر حجم معلوم من اللبن الحليب كغشاء رقيق على مساحة محددة بالشريحة . بعد ذلك يجفف الغشاء ، ويثبت ويصبغ ويفحص بالعدسة الزيتية .

وحيث إن مساحة المجال الميكروسكوبى وحجم العينة المختبرة معروفين .. فإنه يمكن تقدير العدد الكلى للبكتيريا الموجودة فى ملليلتر واحد من الحليب .

فى هذا التدريب .. ستقدر عدد البكتيريا الموجود فى عينة لبن حليب عال الجودة High-grade milk ، وفى عينة لبن حليب منخفض الجودة Low-grade milk ، وفى عينة لبن حليب لحيوان مصاب بمرض التهاب الضرع mastitis .

ويتميز اللبن الحليب المأخوذ من حيوانات مصابة بالتهاب الضرع (عدوى تصيب الضرع) ، باحتوائه على عدد كبير من كرات الدم البيضاء leucocytes . وتظهر هذه فى الأغشية المصبوغة بأزرق الميثيلين ، كخلايا ذات لون أزرق ، دائرية أو غير منتظمة الشكل . وتستخدم هذه الخلايا فى التهام وإبادة البكتيريا المهاجمة داخل الضرع . أحيانا نشاهد سلسلة البكتيريا السبحية الملتَهَمة جزئيا ، بارزة من كرات الدم البيضاء (انظر شكل ١) .



شكل (١) : مظهر مجالات الميكروسكوب لعينات مختلفة من اللبن الحليب :
(أ) أعداد قليلة ، لبن عال الجودة .
(ب) سلاسل طويلة من البكتيريا السبحية وكرات دم بيضاء عديدة ، غالبا تمثل لبن حليب مأخوذاً من بقر مصاب بالتهاب الضرع .
(جـ) بكتيريا عديدة ذات أشكال مختلفة ، غالبا تمثل لبن حليب مخزناً فى أوعية قذرة .

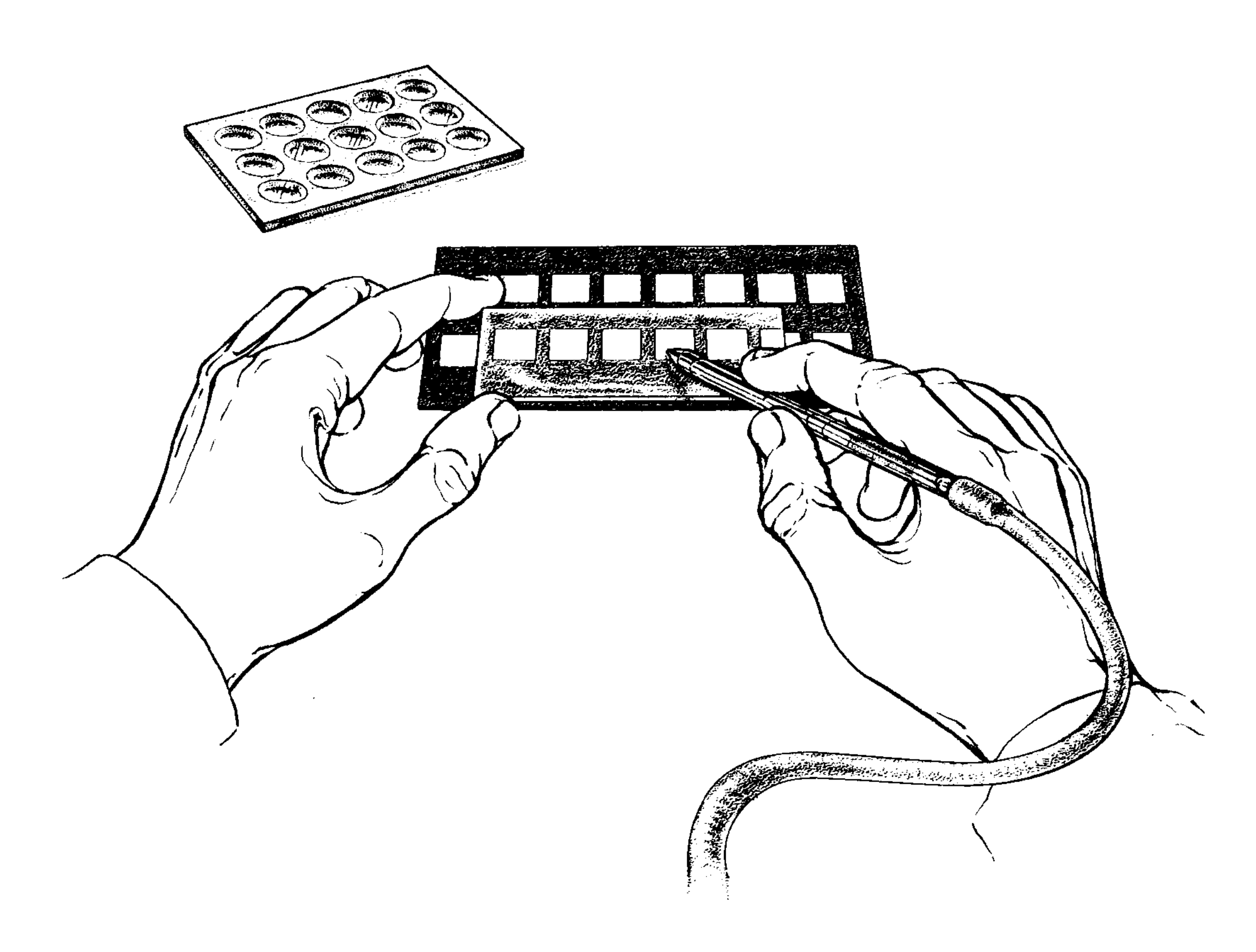
PROCEDURE طريقة العمل

١ – اسحب الحليب بماصة بريد Breed pipette لنقطة أعلى قليلا من علامة الـ ٠,٠١ مل .

٢ – جفف الحليب الموجود على طرف الماصة بورقة نشاف .

٣ – المس طرف الماصة بورقة نشاف ، واسحب سطح اللبن إلى علامة ٠,٠١ مل بالخاصة الشعرية .

٤ – ضع طرف الماصة فى مركز المربع الموجودة على الشريح (مساحته ١ سم٢) . فرغ ما بالماصة بالنفخ الخفيف لتكون قطرة (انظر شكل ٢) .



شكل (٢) : استعمال كارت دليل وشريحة وماصة بريد فى تحضير غشاء للعد الميكروسكوبى المباشر . طول أنبوبة المطاط حوالى ٣٠ سم ، طرفها الآخر فى فم القائم بالفحص . فى الجزء العلوى من الصورة شريحة زجاجية ذات مساحات دائرية ١ سم٢ ، يمكن أيضا استعمالها فى العد الميكروسكوبى المباشر .

٥ – باستعمال الإبرة المستقيمة .. انشر قطرة اللبن على المربع (١ سم٢) (بادئاً من حواف المربع إلى مركزه) بحيث تغطى المربع كله بانتظام .

اعمل غشائين من نفس العينة على الشريحة .

كرر الخطوات السابقة من ١ إلى ٥ بالنسبة للعينة الثانية .

٦ – جفف أغشية اللبن ببطء ، وهى موضوعة على سطح مستو تماما بالقرب من مصباح كهربائى .

يراعى الحذر الشديد إذا استعملت الحرارة فى تجفيف الغشاء ، لأن التجفيف السريع سيؤدى إلى تشقق الغشاء ، وفى هذه الحالة تعاد العملية من جديد (يحتاج ذلك إلى مران) .

٧ – اغمس الشريحة بأغشيتها المجففة ى صبغة ازرق المثيلين تركيب Levowitz-weber (انظر الملحق) لمدة دقيقتين .

٨ – تخلص من الصبغة الزائدة بورق النشاف .

٩ – جفف جيدا .

١٠ – اغسل الشرائح بالماء ، وصب الماء الزائد وجفف بالهواء .

١١ – افحص الغشاء باستعمال العدسة الزيتية ، عد البكتيريا الموجودة فى المجال . تحسب التجمعات العنقودية أو الكتل أو السلاسل كخلية بكتيريا واحدة ، وذلك لأن كل مجموعة متجمعة ستعطى مستعمرة واحدة فى حالة استعمال الأطباق . للحصول على نتائج دقيقة .. يجب عد البكتيريا الموجودة فى عدة مجالات ، ويحسب متوسط ما فى المجال الواحد . وكلما زادت أعداد البكتيريا بالحليب ، احتجنا لعدد أقل من المجالات الميكروسكوبية للوصول إلى نتائج دقيقة . والقاعدة السليمة هو العد فى ١٠٠ مجال فى حالة اللبن الحليب العالى الجودة ، وفى ١٠ مجالات فى حالة الحليب المنخفض الجودة .

١٢ – من نتائج العد .. يمكن تقدير عدد البكتيريا فى ١ مل حليب .

باستعمال ٠,٠١ مل حليب منشورة على مساحة ١ سم٢ ، ومع مجال ميكروسكوبى قطره ٠,١٦ مم ، فإن عدد البكتيريا فى المجال الواحد مضروبا فى ٥٠٠ ٠٠٠ ، يعطى عدد البكتيريا فى واحد ملليلتر من عينة الحليب الأصلية .

اشتقاق العامل الخاص بطريقة العد الميكروسكوبى

Derivation of Factor for Microscopic Count

قطر مجال الميكروسكوب = ٠,١٦ مم

نق = ٠,٠٨ مم

مساحة مجال الميكروسكوب = ط نق^{٢}

= ٣,١٤١٦ × ٠,٠٨ × ٠,٠٨ = ٠,٠٢ مم^{٢}

= $\frac{٠,٠٢}{١٠٠}$ = ٠,٠٠٠٢ سم^{٢}

عدد المجالات فى ١ سم^{٢} = ١ ÷ ٠,٠٠٠٢ = ٥٠٠٠ مجال

∴ تم نشر $\frac{١}{١٠٠}$ من عينة الحليب على مساحة ١ سم^{٢} ، وأن كل مجال ميكروسكوبى يحتوى على $\frac{١}{١٠٠}$ × $\frac{١}{٥٠٠٠}$ أى ١ / ٥٠٠ ٠٠٠ مل حليب

∴ كل بكتيريا واحدة فى مجال الميكروسكوب تمثل ٥٠٠ ٠٠٠ / مل من الحليب

عدد البكتيريا الكلى فى واحد مجال × ٥٠٠ ٠٠٠ = العدد فى ١ مل حليب

عدد البكتيريا الكلى فى ١٠ مجالات × ٥٠ ٠٠٠ = العدد فى ١ مل حليب

عدد البكتيريا الكلى فى ٥٠ مجال × ١٠ ٠٠٠ = العدد فى ١ مل حليب

عدد البكتيريا الكلى فى ١٠٠ مجال × ٥٠٠٠ = العدد فى ١ مل حليب

لاتعتبر طريقة العد الميكروسكوبى المباشر طريقة رسمية لتقدير جودة الحليب ، وذلك لأنها طريقة غير حساسة نسبيا . ولكن يمكن استعمالها لعد كرات الدم البيضاء فى ألبان الماشية المصابة بأمراض مثل مرض التهاب الضرع ، ويمكن استعمالها أيضا لفحص بعض أنواع الحليب الموردة للمصانع .

أسـئلة QUESTIONS

١ - تعطى طريقة العد الميكروسكوبى المباشر ، باستمرار أعدادا من البكتيريا / مل ، أعلى بكثير من طريقة العد بالأطباق . اشرح ؟

٢ - إذا أظهر غشاء مصبوغ كثيرا من السلاسل القصيرة لبكتيريا كروية فى غياب أعداد كبيرة من كرات الدم البيضاء ، ماذا تستنتج من ذلك لتاريخ العينة الجارى فحصها ؟

تــدريـــب (٧٢)

الأغذية المتخمرة Fermented Foods

الكرنب المخلل Sauerkraut

يعتبر التخمير fermentation واحداً من أقدم طرق حفظ الأغذية . وفى الكرنب المخلل sauerkraut .. فإنه نتيجة لعملية التخمير ، ينتج الحامض بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك ؛ مما يؤدى إلى تثبيط البكتيريا المسببة للفساد .

يحضر الكرنب المخلل بتمليح الكرنب المقطع لشرائح صغيرة بالملح الجاف بنسبة حوالى ٣٪ وزنا . ترص طبقات الكرنب والملح بالتبادل فى أوعية وتترك للتخمير . يقوم الملح بسحب العصير من أنسجة الكرنب ، فيتكون محلول ملحى brine تنمو فيه البكتيريا المكونة للأحماض . تخمر هذه البكتيريا السكريات إلى أحماض عضوية – أساسا حامض لاكتيك – الذى يعمل كمادة حافظة ، ويمنع نمو البكتيرية التعفنية Putrefactive bacteria .

طريقة العمل PROCEDURE

سيحضر الكرنب المخلل بواسطة مشرف الدرس العملى بالطريقة التالية :

١ – تخلص من الأوراق الخارجية والتالفة ومن الجزء السفلى للساق ، واقسم الكرنبة إلى نصفين .

٢ – قطع إلى شرائح صغيرة ، ثم رص الكرنب فى طبقات متبادلة مع طبقات الملح فى وعاء . يضاف الملح بنسبة حوالى ٣٪ من الوزن .

٣ – اضغط الخليط حتى تخرج طبقة من عصير الكرنب . ضع ثقلاً ، ثم غط سطح الوعاء بشاش نظيف .

٤ – احفظ على درجة ٣٠°م .

٥ – افحص الكرنب بعد يومين وأسبوع وأسبوعين من بداية الحفظ ، على النحو التالى :

(أ) تذوق الطعم وشم الرائحة . سجل ملاحظاتك عن الطعم والنكهة والرائحة .

(ب) اعمل غشاءً من العصير واصبغه بصبغة أزرق الميثلين . افحص ميكروسكوبيا وارسم الكائنات المميزة .

رغم أن تطور أنواع وأعداد الميكروبات المخمرة يبدو كما لو كان وليد الصدفة ، إلا أن مجموعات عديدة متداخلة من الظروف البيئية هى التى تسبب هذا التطور ، يتضمن ذلك وجود سكريات قابلة للتخمر ، والملح ، والظروف اللاهوائية ، والرقم الأيدروجينى الحامضى والحرارة ، التى تؤدى كلها إلى انتخاب وسيادة الكائنات اللازمة لإنتاج الكرنب المخلل .

وتتغير الميكروبات المخمرة بانخفاض الرقم الأيدروجينى . وفى مراحل مختلفة .. فإنها يجب أن تحتوى على *Lactobacillus plantaram* and *Leuconostoc mesenteroides* ، لتكون الطعم والنكهة والرائحة المرغوبة .

المشـــروبـات Beverages

لايحفظ التخمير فقط أغذية معينة ، بل ويحسن أيضا الطعم والقيمة الغذائية لبعض الأغذية . وتتطلب معظم الأغذية المتخمرة نمو ونشاط واحد أو أكثر من أنواع بكتيريا حامض اللاكتيك ، أو الخميرة ، أو خليط منهما .

ويتحدد التخمر الذى يحدث بالغذاء أساسا ، بمحتواه الكربوهيدراتى ورقمه الأيدروجينى . فالأغـــذية المحتـــوية على الكربوهيـــدرات ، المرتفعـــة الحمـــوضة . الضعيفة التنظيم للحموضة poorly-buffered ، تتجه إلى التخمر الكحولى بالخمائر . بينما تتجه الأغذية المحتوية على الكربوهيدرات ، المنخفضة الحموضة ، جيدة التنظيم well-buffered ، عادة إلى التخمر اللاكتيكى .

فى هذا التدريب .. ستفحص الكائنات الدقيقة فى بعض الأغذية المتخمرة .

طريقة العمل PROCEDURE

اللبنة المنتجة بالبادئات Cultured Buttermilk

تصنع اللبنة عادة من لبن مبستر منزوع منه القشدة – بالكامل أو جزئيا – ، فتخمر بواسطة بكتيريا حمض اللاكتيك لإنتاج حامض لاكتيك ومواد طيارة ، مصحوبا بإنتاج خثرة ، وتكون طعم ورائحة مرغوبة .

تحضر اللبنة بتحميض souring اللبن المنزوع القشدة ، بمزرعة خليطة من بكتيريا حامض اللاكتيك تعرف بالبادئ starter . عندما يتكون بالمزرعة حوالى ٠,٨ – ٠,٩٪ حامض لاكتيك ، يوقف التخمر بالتبريد وتكسر الخثرة بالرج .

تحتوى البادئات التجارية عادة على بكتيريا

Streptococcus lactis, Leuconostoc dextranicum And *Leuconostoc citrovorum.*

وتهاجم أفراد جنس *Leuconostoc* حامض الستريك الموجود باللبن ، لتكون داى أسيتيل Diactelyl ، الذى يعطى الرائحة المميزة للألبان المتخمرة .

١ – لقح أنبوبة كبيرة أو دورق لبن مبستر منزوع منه القشدة ، بحوالى ١٪ حجما من مزرعة البادئ . وزع اللقاح بلف الأنبوبة عدة مرات بسرعة بين الكفين أو برج الدورق .

٢ – حضن على درجة حرارة الغرفة حتى الدرس العملى التالى (يفضل من ١٥ – ١٨ ساعة على درجة حرارة ٢١° م) .

٣ – رج اللبن المحمض soured milk لتكسير الخثرة . لاحظ الطعم والنكهة والرائحة فى اللبنة الناتجة .

من السهل الحصول على مزارع البادئات starter cultures من شركات عديدة فى صورة مسحوق مجفف . وهذه يجب تنشيطها بالنقل المتكرر لعدة مرات فى اللبن ، حتى يمكن الحصول على مزرعة متوازنة جيدا .

التخمر الكحولى لعصائر الفاكهة Alcoholic Fermentation of Fruit Juices

غالبًا ما يحدث تخمر كحولى فى البيئة الحامضية الرطبة المحتوية على كربوهيدرات قابلة للتخمر ، وذلك بواسطة الخمائر . ومعظم عصائر الفاكهة تنطبق عليها هذه المواصفات ، ودرجة حرارة من ٢٠ إلى ٣٠° م تناسب نمو الخمائر . ويسير التخمر الذى يتم بواسطة الخمائر المعتادة للبيرة والنبيذ (Saccharomyces) طبقا للمعادلة العامة التالية :

$$\underset{\text{سكر سداسى}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{كحول إيثايل}}{2\ C_2H_5OH} + 2\ CO_2 \uparrow$$

ويطلق عادة اصطلاح نبيذ Wine على الناتج من التخمر الكحولى لعصير العنب ، ولكن عصائر الفاكهة الأخرى المتخمرة وحتى عصائر النباتات المتخمرة تسمى أيضا « نبيذ » . توجد أنواع مختلفة من نبيذ الأعناب berries والكمثرى وثمار الموالح والهندباء dandelion ، وأنواع أخرى من الفواكه .

ستوضح التجربة التالية تخمر عصير العنب والتفاح لتكوين نبيذ .

١ – لقح أنبوبة بيئة عصير العنب ، وأنبوبة بيئة عصير التفاح المعطاة لك بـ ٠,١ مل مزرعة سائلة للخميرة (*Saccharomyces cerevisiae* variety *ellipsoideus*) .

٢ – حضن على درجة ٢٥° م حتى الدرس العملى التالى .

٣ – لاحظ الطعم والنكهة والرائحة فى الناتج من التخمر .

الجــــبن Cheese

يعتبر كثير من الميكروبات مسئولاً عن الطعم ، والنكهة ، والرائحة ، والصفات الأخرى المميزة لأنواع الجبن العديدة ؛ فلكل نوع من أنواع الجبن الكائنات الدقيقة المميزة له . ورغم أن التعريف النهائى للميكروبات يعتبر غير عملى فى هذه الحالة ، إلا أن الهدف من التجربة التالية هو التعرف على التركيبة العامة للميكروبات المميزة لعدة أنواع من الجبن ، وذلك بزرع أطباق من عينات جبنة مستحلبة emulsified cheese .

بعد وزن الجبنة .. فإنها تجهز لعمل الأطباق بالمزج الجيد مع ماء معقم فى خلاط معقم sterile blender .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – ازرع تخفيفات ١٠^{-٢} ، ١٠^{-٣} ، ١٠^{-٤} من عينة الجبنة المستحلبة على أطباق آجار اللاكتوز ، ودليل بروم كريزل بربل Brom-cresol-purple lactose agar .

٢ – حضن الأطباق على درجة ٣٠°م لمدة يومين .

٣ – عد المستعمرات واحسب عدد الميكروبات لكل واحد جرام جبنة .

٤ – اترك الأطباق على درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع .

٥ – لاحظ الأنواع المختلفة من المستعمرات الناتجة من أنواع الجبن المختلفة . حضر أغشية من المستعمرات المختلفة ، واصبغ بطريقة جرام .

٦ – لاحظ قوام ، وطعم ، ونكهة ، ورائحة أنواع الجبن المختلفة .

٧ – اكتب ملاحظاتك فى جدول بورق التقرير الخاص .

أســـــئلة QUESTIONS

١ – كثير من المواد العضوية – مثل : اللبن الحليب على درجة حرارة الغرفة ، أو السكر فى الفواكه القابلة للتخمر – تمر طبيعيا بسلسلة من التحولات التى تتم بواسطة تتابع الكائنات الدقيقة . وفى حدود معينة .. فإن ظهور هذه الميكروبات يمكن التنبؤ به . ما هى التغيرات الكيميائية التى تحدث فى المثالين المعطيين (اللبن الحليب وسكر الفواكه) ، وما هى الكائنات الدقيقة التى تسبب هذه التغيرات ؟

٢ – ما هى الكائنات الدقيقة التى توجد فى كل من :

اللبن الزبادى (اليوجورت) Yogurt ، اللبنة البلغارية Bulgarian buttermilk ، لبن الكوميس Kumiss ؟

٣ – ما هى العلاقة الكيميائية بين داى اسيتيل Diacetyl والأستيل ميثل كربينول Acetyl methyl carbinol ؟

٤ – ما الذى يميز النبيذ الخفيف light wine عن النبيذ المقوى fortified wine ؟

٥ – فى صناعة البيرة ، لماذا تعرض الحبوب لتأثير الشعير المنبت ؟

٦ – ما المقصود بالجبنة ذات الخثرة الحامضية Acid curd cheese ؟ ، والجبنة المخثرة بالمنفحة Rennet curd cheese ؟ والجبنة الجافة Hard cheese ؟ والجبنة الطرية Soft cheese ؟ أذكر أمثلة بالأسماء فى كل حالة .

٧ – اعتمدت صناعة الجبن فى بدايتها على التنوع فى الظروف البيئية لانتخاب المجموعات الميكروبية المرغوبة ، لإنتاج نوع معين من الجبن . ولكن فى الطرق الحديثة لصناعة الجبن .. تستعمل مزارع البادئات مع التحكم فى الظروف البيئية المحيطة . ما هى بعض هذه الظروف البيئية ؟

الباب الخامس عشر

ميكروبيولوجيا الأراضى

SOIL MICROBIOLOGY

يحتوى حجم التربة الذى يعادل ملء قبضة اليد على عالم واسع من الكائنات الدقيقة ، ذات أعداد وأنواع على درجة كبيرة من التنوع . وكل كائن حى يجاهد للحصول على المواد المغذية ، والطاقة اللازمة لنموه وتكاثره .

وتحت الظروف الطبيعية .. تمثل الكائنات الدقيقة الموجودة فى مكان معين صورة دائمة التغير ، والتى هى انعكاس للتغيرات البيئية . ومثالاً على ذلك ففى الأراضى .. قد تختلف الظروف لدرجة تكفى لسيادة أنواع معينة من الميكروبات ، تختلف تماما عن بعضها خلال مسافات قصيرة ، قد تصل إلى سنتيمترات .

يؤدى سقوط الفواكه الناضجة القابلة للتخمر فى الخريف إلى توفر وسط لنمو الخمائر ، التى سرعان ما يعقبها نمو بكتيريا *Acetobacter* ، التى تحصل على طاقتها من أكسدة الكحول الذى كونته الخمائر .

أما إضافة الجير للتربة liming .. فتؤدى إلى تزايد أعداد الـ *Azotobacter* التى لا تستطيع النمو عادة تحت رقم أيدروجينى أقل من ٦,٠ . وفى نفس الوقت ، فإن اضافة الجير ، تسبب تثبيط نمو الأنواع المتحملة للحموضة acid-tolerant مثل *Thiobacillus thiooxidans* – وهى البكتيريا الأوتوتروفية المؤكسدة للكبريت – التى تنمو بكفاءة عند رقم أيدروجينى pH –٢,٠ ، أو أقل . ويؤدى سقوط مطر مفاجئ ، وتجمع المياه فى البقع المنخفضة من الحقل ، إلى تكوين مستنقعات تمنع تبادل الغازات بحرية . وعلى ذلك .. فإنه سرعان ما تختفى الميكروبات الهوائية العصوية تاركة مكانها للأنواع المخمرة اللاهوائية ، وتحل العمليات اللاهوائية مثل انطلاق النيتروجين Denitrification بواسطة بكتيريا *Pseudomonas* ، محل العمليات الهوائية مثل النترتة (التأزت) Nitrification ، التى كانت تقوم بها البكتيريا الهوائية الأوتوتروفية *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* .

يشجع التغير فى درجات الحرارة من سخونة منتصف النهار إلى برودة الليل بشهر أغسطس بشكل تبادلى ، تطور مجاميع معينة من الكائنات الدقيقة .

فى بعض الأوقات التى تلى الفترات المناسبة لتطور الفطريات ، فإن أكياس الجراثيم الإسبورانجية تنضج وتنفجر وتخرج منها الجراثيم ، التى تنثرها الرياح بأعداد كبيرة فوق الحقل ، مسببة فى ذلك الوقت سيادة الفطريات .

بجانب هذه الصورة الواضحة الخاصة بالتغير فى المجتمع الميكروبى ، فإن عشرات الألوف من كائنات ميكروبية أخرى - مثل : البروتوزوا ، ، والأكتينوميسيتات ، ومثبتات النتروجين التكافلية ، ومحللات السلليلوز ، وغيرها - تكون منهمكة فى القيام بأنشطة كيميائية شديدة التداخل ، بصورة لا يمكن تخيلها حتى تحت أكثر التصورات ذكاء . ومع استمرار تغير الوسط .. فإن كل مجموعة ميكروبية تأخذ شكلها الخاص ، حتى لو لم تكن مجموعة سائدة ولكن كأقلية تخدمها الظروف لفترة قصيرة .

تعتبر دورة النيتروجين Nitrogen cycle ، واحدة من الدورات الأساسية التى تحدث فى الطبيعة . وهى تتواصل أساسا من خلال الأنشطة البيوكيميائية لميكروبات التربة . التجارب التى توضح دور الميكروبات فى الدورات الأخرى الأساسية ، وهى دورات الكربون ، والكبريت والتى أمكن إدراجها فى هذا الكتاب ، وستجد فيما لديك من مراجع المناقشات الخاصة بها .

يجب التأكيد على أن الدور الذى تلعبه المجموعات الميكروبية المختلفة فى الأراضى ، ليس مفهوما تماما . فحتى عشر سنوات مضت ، كان يعتقد أن تثبيت النيتروجين الجوى تقوم به ثلاثة أجناس من البكتيريا هى *Rhizobium, Azotobacter* and *Clostridium* . ورغم أن هذه الأجناس مازالت هى الأجناس الذائعة الشهرة من حيث تثبيت النيتروجين الجوى ، إلا أنه اتضح اليوم من خلال استعمال نظائر النيتروجين ، أن أنواعا مختلفة من البكتيريا والطحالب الخضراء المزرقة لها القدرة على تثبيت النيتروجين الجوى . وقد يحدث موقف مماثل فيما يتعلق بعملية النترتة ؛ فاليوم يبدو أن عملية النترتة الحيوية تتم بواسطة جنسين من البكتيريا الأوتوتروفية ، ولكن بحوث المستقبل قد تبين أن الميكروبات التى تشارك فى عملية النترتة ، من الممكن أن تكون أكثر انتشارا وتنوعا مما هو معروف حتى الآن .

تـدريـــب (٧٣)

المحتوى الميكروبى فى الأراضى Microbial Population of Soils

لا تنمو كثير من الميكروبات التى توجد فى الأراضى - مثل البروتوزوا والطحالب - بالطرق العادية المستعملة فى الميكروبيولوجى . ومع هذا .. فإن محتوى التربة من الميكروبات الذى يتكون أساسا من البكتيريا والأكتينوميسيتات والفطر ، والتى تصل أعدادها لعدة ملايين فى الجرام الواحد من التربة ، يمكن تقديرها فى المعمل .

PROCEDURE طريقة العمل

أمامك عينتى تربة ، واحدة خصبة من حدائق ، والثانية رملية طفلية – افحص كل تربة بطريقة الأطباق كما يلى :

١ – زن ١ جم تربة وضعه مباشرة فى زجاجة بها ٩٩ مل محلول تخفيف – اترك الزجاجة فى مكانها لمدة (١٠ – ١٥) دقيقة ، ورج جيدًا .

٢ – اجر تخفيفات من العينة (كما فى تدريب ١٥) ، وازرع تخفيفات ١٠^-٤ ، ١٠^-٥ ، ١٠^-٦ من عينة التربة ، على أطباق آجار مستخلص الخميرة ، والتربتون Tryptone-yeast extract agar .

٣ – حضن الأطباق على درجة ٣٠° م لمدة ٤ أيام ، وبعد العد حضن ثانية لمدة أسبوع آخر .

٤ – عد المستعمرات وقدر عدد البكتيريا فى الجرام الواحد من كل عينة تربة حسب ما تم بهذه الطريقة .

٥ – حضر أغشية مصبوغة بجرام من خمسة مستعمرات مختلفة الأنواع .

QUESTIONS أسـئلة

١ – ما هى المجاميع العامة من البكتيريا التى توجد فى التربة ولا تظهر فى نتائج طريقة العد بالأطباق ، التى اتبعتها فى هذا التدريب ؟

٢ – كيف تُطوِّر هذه الطريقة ، لتقدر عدد البكتيريا المكوِّنة للجراثيم sporeformers فى واحد جرام تربة ؟

٣ – ما هى الخطوات التى تتبعها لتقدير عدد الفطريات غير الظاهرة مع مستعمرات البكتيريا ؟

تـدريـــب (٧٤)

Nitrogen Cycle دورة النيتروجين

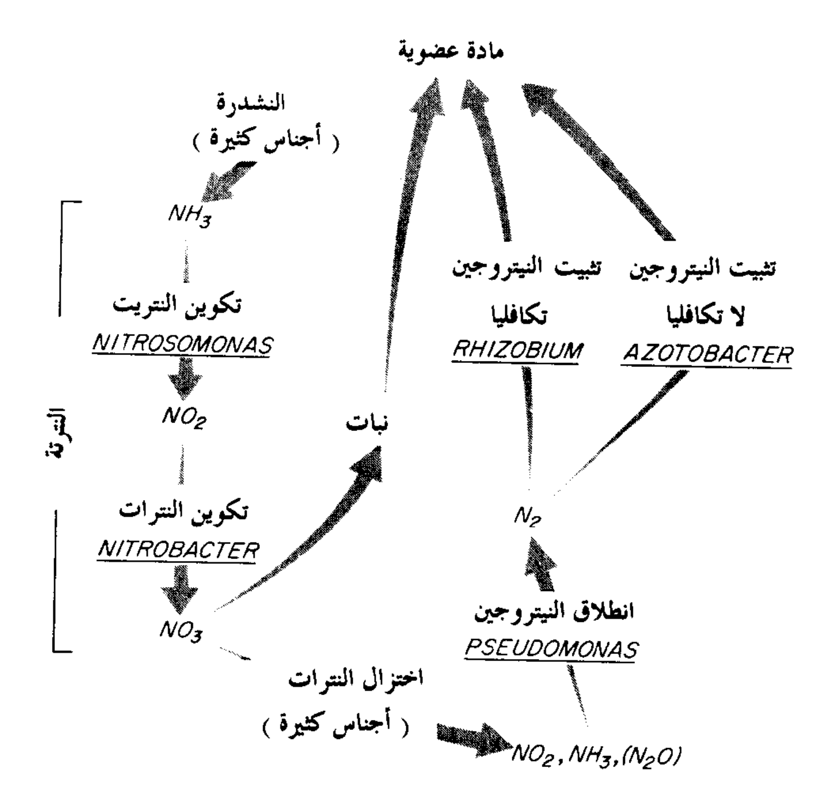
النيتروجين عنصر أساسى لكل أنواع الحياة ، لكن طبيعة المركبات النيتروجينية التى تفى بالاحتياجات الغذائية تختلف من كائن لآخر . وتعتمد الحياة على استمرار سد النقص فى المركبات النيتروجينية فى نطاق من حالات الأكسدة ، والاختزال . وتسمى هذه التحولات مجتمعة بدورة النيتروجين Nitrogen cycle ، وتلعب الكائنات الدقيقة فيها دورا رئيسيًّا .

وبينما تعتمد النباتات على الأمونيا ، أو النترات كمصدر للنيتروجين ، والحيوانات على النيتروجين العضوى ، فإن الميكروبات تختلف كثيرا فى احتياجاتها . هذا التنوع فى تمثيل النيتروجين بواسطة الميكروبات ، يوفر الخطوات الأساسية فى دورة النتروجين .

فى هذا التدريب .. ستدرس التحولات المختلفة التى تمثل الجزء الرئيسى فى دورة النيتروجين .

النشـــدرة Ammonification

تتعرض مركبات النيتروجين العضوية فى الطبيعة – البروتين الحيوانى ، والنباتى ، والميكروبى ، وكذلك المخلفات مثل : اليوريا – لعمليات هدم بواسطة مجموعات عديدة من الميكروبات الهيتروتروفية ، وتنتج الأمونيا ونواتج نهائية أخرى عديدة (انظر شكل ١) .



شكل (١) : دورة النيتروجين .

(أسماء أجناس البكتيريا المذكورة هى أمثلة هامة للأجناس التى تقوم بالتفاعل . وفى حالات كثيرة فإن أجناسا أخرى تشارك فى التفاعل) .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – أمامك خمس أنابيب بها محلول ٤٪ ببتون معقم . عامل كل أنبوبة بطريقة مختلفة كما يلى :

(أ) اترك أنبوبة للمقارنة .

(ب) لقح أنبوبة بغمسة إبرة من التربة .

(جـ) لقح أنبوبة ببكتيريا *Bacillus cereus* .

(د) لقح أنبوبة ببكتيريا *Pseudomonas fluorescens* .

(هـ) لقح أنبوبة ببكتيريا *Proteus vulgaris* .

٢ - حضن الأنابيب الخمسة على درجة ٣٠° م لمدة ٤٨ ساعة .

٣ - اختبر لوجود الأمونيا . ضع نقطة من محلول نسلر Nessler's reagent فى تجويف طبق الاختبار الخزفى Porcelain spot plate ، وبقضيب زجاجى ، أو ماصة ضف نقطة من المادة المراد اختبارها . تكون لون أصفر يعتبر دليلا على وجود الأمونيا .

النترتة (التأزت) Nitrification

الأمونيا الناتجة من تحلل البروتين ، والأحماض الأمينية ، والصور العضوية الأخرى للنيتروجين قد تتعرض لما يلى :

١ - تمثل بواسطة الميكروبات إلى بروتين خلوى .

٢ - تؤكسد أولا إلى نتريت Nitrite ثم إلى نترات Nitrate بواسطة بكتيريا النترتة (التأزت) Nitrifying bacteria ، وتسمى عملية الأكسدة هذه باسم نترتة (تأزت) Nitrification ، وتتم على خطوتين بواسطة جنسين من البكتيريا الأوتوتروفية هما : جنس *Nitrosomonas* الذى يؤكسد الأمونيا إلى نتريت ، وجنس *Nitrobacter* الذى يؤكسد النتريت إلى نترات .

طريقة العمل PROCEDURE

تكون النتريت Nitrite Formation

١ - لقح بيئة تكوين النتريت Nitrite-formation medium بحوالى ٠,١ جم من تربة ذات رقم أيدروجينى متعادل ، أو قلوى خفيف . حضن على درجة ٢٥ - ٣٠° م .

ملحوظة

يجب أن تكون بيئة تكوين النتريت (انظر الملحق) خالية من النيتروجين بكل صوره عدا ملح الأمونيوم .

٢ - على فترات (كل أسبوع) ، اختبر المزرعة لوجود النتريت . اخلط ٣ نقط من محلول ترومسدورف Trommsdorf's Solution مع نقطة من حامض كبريتيك مخفف (١ حامض

مركز إلى ٣ ماء) فى تجويف طبق الاختبار الخزفى . ضف نقطة من المزرعة بواسطة قضيب زجاجى ، أو ماصة ، واخلط جيدًا . تكون لون أزرق مسود يدل على وجود النتريت .

ملحوظة

يستعمل قضيب زجاجى ، لأن استعمال إبرة التلقيح قد يعطى تفاعلاً مضللاً .

٣ – اختبر المزرعة لوجود الأمونيا (بإستعمال محلول نسلر) مرة كل أسبوع .

مع التحضين الممتد .. يصبح هذا التفاعل سالبًا نتيجة الأكسدة الكاملة للأمونيا إلى نتريت .

٤ – كل أسبوع – بعد رج الراسب – جهز شرائح مصبوغة بجرام ، وافحص لوجود الأنواع النموذجية المسببة .

تكوين النترات Nitrate Formation

١ – لقح بيئة تكوين النترات Nitrate-formation medium بحوالى ٠,١ جم تربة . حضن على درجة ٣٠° م .

٢ – اختبر الدوارق كل أسبوع بدليل ترومسدورف حتى يصبح الاختبار سالبًا بالنسبة للنتريت . هذه الخطوة هامة ، لأن دليل داى فينيل أمين Diphenylamine يعطى نتائج موجبة لكل من النتريت ، والنترات .

٣ – فى تجويف طبق الاختبار الخزفى .. ضع نقطة من دليل داى فينيل أمين ، ونقطتين من حامض كبرتيك مركز ، ثم ضف نقطة من المزرعة المطلوب فحصها . تكون لون أزرق مسود يدل على وجود النترات .

٤ – كل أسبوع – بعد رج الراسب – حضر أغشية مصبوغة بجرام ، وافحص لوجود الأنواع النموذجية المسببة (انظر شكل ١) .

انطلاق النتروجين Denitrification

تتم عملية اختزال النترات بواسطة مجموعة من الميكروبات القاطنة بالتربة – وقد يكون النتريت ، والأمونيا ، وأكسيد النيتروز ، وغاز النيتروجين ، من بين النواتج النهائية لعملية اختزال النترات Nitrate reduction . إذا كان الاختزال كاملاً إلى نتروجين غازٍ ، فإن العملية تسمى انطلاق نيتروجين Denitrification .

وتقوم بعض أنواع الميكروبات بعملية النشدرة بنشاط تحت ظروف هوائية . ولكن تحت الظروف اللاهوائية .. فإنها تقوم بعملية انطلاق النيتروجين . وتعمل النترات كمستقبل للأيدروجين H-acceptor بالنسبة لهذه الأنواع فى غياب الأكسجين الجوى ، فى تفاعل يسمى بالتنفس اللاهوائى Anaerobic respiration (انظر شكل ١) .

طريقة العمل PROCEDURE

١ – لقح أنبوبة مرق النترات Nitrate broth محتوية على أنبوبة درهام Durham بحوالى ٠,١ جم تربة . ولقح أنبوبة أخرى ببكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* .

٢ – لقح أنبوبة مرق خال من النترات Nitrate-free broth تحتوى على أنبوبة درهام ، بحوالى ٠,١ جم تربة ، وأنبوبة أخرى ببكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* .

٣ – حضن الأنابيب الأربعة على درجة ٣٠°م لمدة أسبوع .

٤ – افحص لتكون غاز .

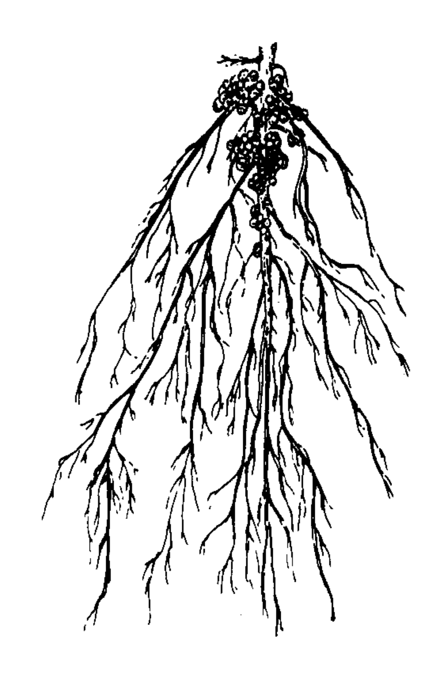
٥ – بعد التحضين ، ضف ١ مل دليل ألفانافثايل أمين α-naphthyl amine (لاتستعمل ماصة لسحب الدليل بالفم) ، وضف ١ مل من محلول حمض سلفانيليك Sulfanilic acid ، لأنابيب المزرعة . تكون لون أحمر خلال ٣٠ ثانية يدل على أن النترات موجودة .

تثبيت النتروجين الجوى Nitrogen Fixation

للكائنات الدقيقة فى الطبيعة دور عظيم الأهمية ، وهو قدرتها – إما منفردة ، أو بالتعايش مع النباتات البقولية – على استخدام النيتروجين الجوى كمصدر للنيتروجين اللازم لخلاياها . ويبدو أن هذه القدرة محدودة فى أجناس قليلة نسبيًا .

تثبيت النتروجين تكافليًا Symbiotic Nitrogen Fixation

معظم النباتات البقولية ؛ مثل : البازلاء ، والفاصوليا ، والبرسيم تحمل على جذورها عقدا nodules عديدة ، ذات نمو منتفخ (انظر شكل ٢) . تتكون هذه العقد نتيجة لعدوى الشعيرات الجذرية ببكتيريا من جنس *Rhizobium* . تعتبر خلايا الرايزوبيوم المسببة للعدوى طفيلية على البقوليات ، وهى تنمو بأعداد كبيرة داخل العقدة ، وتحصل على مصادر الطاقة اللازمة لنموها من النبات العائل . وفى أثناء النمو .. فإن البكتيريا تثبت النيتروجين الغازى من الجو ويصبح النيتروجين ميسرًا للنبات . وهكذا .. فإن كلا من البكتيريا والنبات يصبحان فى علاقة تكافلية symbiotic relationship ؛ أى منفعة متبادلة .



شكل (٢) : عقد جذرية على نبات البرسيم تحتوى بكتيريا مثبتة للنيتروجين .

تثبيت النتروجين لاتكافليًّا Non-Symbiotic Nitrogen Fixation

على عكس عملية تثبيت النتروجين بواسطة جنس رايزوبيوم الذى يعيش تكافليا مع نباتات معينة .. فإن بعض أنواع أخرى من البكتيريا تثبت النيتروجين أثناء معيشتها فى التربة فى الحالة الحرة . وفى مقدمة هذه الأنواع ، الجنس البكتيرى *Azotobacter* ، الذى يؤكسد المواد العضوية الموجودة بالتربة كمصدر للطاقة ، ويثبت النيتروجين الجوى كمصدر لنيتروجين الخلية .

كما أن البكتيريا الخضراء المزرقة blue-green bacteria ، والكلوستريديا Clostridia ، والبكتيريا الأرجوانية غير الكبريتية الممثلة للضوء Purple non-sulfur photosynthetic bacteria ، وأنواع أخرى من البكتيريا السالبة لجرام تستخدم أيضا النيتروجين الغازى بطريقة لاتكافلية (انظر شكل ١) .

والبكتيريا التى تثبت النيتروجين الحر من الهواء ، يمكن تنميتها على بيئة لاتحتوى على نيتروجين ، لكن تحتوى فقط على : أملاح غير عضوية ، وكربوهيدرات بسيطة تحصل منها على الطاقة .

طريقة العمل PROCEDURE

تثبيت النيتروجين تكافليا

١ – اختر عقدة من جذر النبات البقولى المقدم لك . فتت العقدة فى نقطة ماء بين شريحتين .

٢ – من هذا التحضير .. انقل غمسة إبرة إلى منتصف سطح شريحة نظيفة . اعمل غشاءً واصبغ بالكريستال البنفسجى .

٣ – افحص بالعدسة الزيتية . انظر بصفة خاصة لوجود خلايا فردية غير منتظمة الشكل irregularly shaped-cells ، مثل : شكل الكمثرى ، والسباق ، وحروف T ، Y . هذه عبارة عن أشكال خلايا الرايزوبيوم فى طور البكتيرويد Bacteroid . تظهر هذه الأشكال فى التحضيرات المعدة من العقدة ، ولكنها لاتظهر من تحضيرات المزارع ذات البيئات الصناعية ، حيث يكون شكل الميكرسكوب عصويًّا rod .

٤ – حضر شرائح مصبوغة من مزرعة نقية لبكتيريا *Rhizobium* منماة على بيئة آجار مستخلص الخميرة ، واللاكتوز glucose yeast-extract agar .

٥ – افحص أشكال الخلايا وقارن مع أشكال الخلايا المفحوصة من العقد .

تثبيت النتروجين لا تكافليا

١ – لقح دورقاً يحتوى طبقة ضحلة غير عميقة من بيئة الأملاح والمانيتول Mannitol-salts medium بحوالى ١ جم تربة خصبة . حضن على درجة ٣٠° م لعدة أيام .

ملحوظة : المانيتول مصدر طاقة مناسب سهل لبكتيريا الأزوتوباكتر ، ولكنه غير سهل الاستخدام بواسطة كثير من ميكروبات التربة الأخرى المزاحمة للأزوتوباكتر .

٢ – بعد تكون النمو السطحى .. جهز أغشية مصبوغة وافحص لوجود خلايا كبيرة عصوية ، أو كروية الشكل ، محاطة بطبقة لزجة .

٣ – افحص مزرعة آجار المانيتول Mannitol-agar النامى عليها *Azotobacter chroococcum* . لاحظ النمو اللامع اللزج .

حضر أغشية مصبوغة وافحصها ، وقارن مظهر الخلايا النامية بالمعمل مع المعزولة حديثا من التربة .

أســـئلة QUESTIONS

١ – ما هى المجاميع الميكروبية ، بالإضافة إلى البكتيريا ، التى تقوم بعملية النشدرة بالتربة ؟

٢ – ما هى المجموعة الكيميائية فى البروتين التى تنتج منها الأمونيا ؟

٣ – هل تنمو بكتيريا النترتة على بيئة عضوية ؟

٤ – ما هو مصدر الطاقة لكل *Nitrobacter ; Nitrosomonas* ؟

٥ – ما هى الظروف البيئية التى تسبب زيادة فى عملية انطلاق النيتروجين ، وانخفاضا فى عملية النترتة بالتربة ؟

٦ - كيف يختلف اختزال النترات عن النترتة ؟

٧ - لماذا يحتمل تكون غاز فى أنبوبة البيئة الخالية من النترات الملقحة بالتربة ؟

٨ - كيف تعلل لوجود أنواع مورفولوجية أخرى ، التى غالبا ما تظهر بالأغشية المصبوغة للأزوتوباكتر الحديث النمو النامى فى بيئة خالية من النيتروجين ؟

٩ - إذا استعملت فى البيئة جلوكوز بدلاً من المانيتول ، ماذا تتوقع أن ينمو ؟

الباب السادس عشر

الميكروبيولوجيا الطبية والمناعة

MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

الجزء الذى استحوذ الانتباه من الميكروبيولوجى ، خلال السنوات الطويلة ، هو الميكروبيولوجيا الطبية Medical Microbiology . فمن المعقول ، أن نركز باستمرار أغلب الجهود البحثية على الميكروبيولوجيا الطبية ، لعلاقتها المباشرة بصالح البشرية . كما أن عملية عزل وتعريف كثير من الميكروبات المسببة للمرض للإنسان ، سبقت تطوير الطرق الفعالة للسيطرة على الأمراض .

وعلم المناعة Immunology شديد الارتباط بالميكروبيولوجيا الطبية ، وهو يختص بتطوير وتحسين المناعة ضد الأمراض ، أما علم السيرولوجى Serology فهو علم آخر شديد الارتباط أيضاً ، ويختص بالخواص الكيميائية والبيوكيميائية لسيروم الدم blood serum . ولقد أصبح للكثير من الطرق السيرولوجية أهمية كبيرة فى الميكروبيولوجيا الطبية .

سندرس فى هذا الباب الطفيليات parasites ، والميكروبات المرضية pathogens ، الخاصة بفم الإنسان وحلقه ، وأيضا طرق التعرف على بعض أنواع الكائنات الأخرى المسببة للمرض للإنسان ، وكذلك بعض الطرق المستعملة فى المناعة والسيرولوجي . ومن بين طرق التشخيص الحديثة القيمة ، استعمال الميكروسكوب الفلورسنتى Fluorescence miroscope (تدريب ٨٤) الذى يجمع فى وقت واحد الطرق الميكروسكوبية مع الطرق السيرولوجية .

تدريب (٧٥)

الفلورا (المجموعة الميكروبية) الطبيعية للحلق

Normal Throat Flora

يحتوى فم وحلق الإنسان السليم على أعداد كبيرة من البكتيريا . أغلب هذه الأنواع غير ضارة ، ولكن بعضها مسبب للمرض . قد تكون الميكروبات المرضية موجودة فى شخص ولكنها لا تحدث المرض ، رغم أن نفس تلك الأنواع قد تسبب المرض فى شخص آخر .

تشمل الميكروبات التى يمكن عزلها من الإنسان السليم :

Staphylococcus aureus, Streptococci of different species, Diphtheroid bacilli, Pneumococci, Gram negative rods, *Klebsiella, Proteus, Neisseria catarrhalis,* Spirilla and *Hemophilus influenzae.*

يعتبر استعمال البيئة التفريقية التى يدخل فى تركيبها كرات الدم الحمراء مع الآجار ، ذا فائدة فى تعريف بعض الميكروبات المرضية . ويستعمل عادة آجار الدم فى الأطباق المخطوطة ، وقد يستعمل أيضا فى الأطباق المصبوبة ، أو فى أنابيب الآجار المائل للتنمية ، ولحفظ الميكروبات ذات الاحتياجات الغذائية الخاصة Fastidious organisms . ويختلف التفاعل الذى يسببه نوع بكتيرى معين باختلاف مصدر الدم . ويفضل عادة دم الحصان ، وإن كانت بعض أنواع الدم الأخرى تستعمل أيضاً . وتكون البيئة التى يضاف إليها الدم ذات نسبة مرتفعة من Na Cl (٥ر٠٪) لمنع التحلل الذاتى spontaneous lysis لكرات الدم الحمراء .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ اصهر أنبوبة (١٢ مل) آجار الدم الأساسية blood - base agar ، وبرد إلى ٤٣ – ٤٥°م . ٤٣ ــ ٤٥ م° .

٢ ــ برد أنبوبة دم معقم فى حمام مائى إلى ٤٣ ــ ٤٥° م .

٣ ــ تحت شروط التعقيم .. انقل ١ر٠ مل من الدم إلى أنبوبة الآجار المبردة وأخلط جيداً بالماصة .

٤ ــ صب الخليط فى طبق بترى . لف الطبق باحتراس فى حركة دائرية لإكمال الخلط . إذا ظهرت فقاقيع هواء على سطح آجار الطبق .. تخلص منها بتمرير لهب بخفة (باستعمال الموقد فى وضع معكوس) على سطح الآجار قبل تصلبه .

٥ ــ امسح swab حلقك بمسّاحة قطنية معقمة sterile cotton swab (قضيب زجاجى رفيع ملفوف عليه قطعة من القطن المعقم) . المسح يكون بعناية للحلق وليس للفم ، مع استعمال الضغط الخفيف أثناء عملية المسح .

٦ ــ بالمساحة القطنية .. خطط بعناية سطح طبق آجار الدم المتصلب .

٧ ــ حضن على درجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة .

نظرا لأن كرات الدم الحمراء تتحلل ذاتيا بالتحضين الطويل على درجة ٣٧° م .. فإنه يجب أن تفحص الأطباق عند ٢٤ ساعة من التحضين أو قبل ذلك إن أمكن .

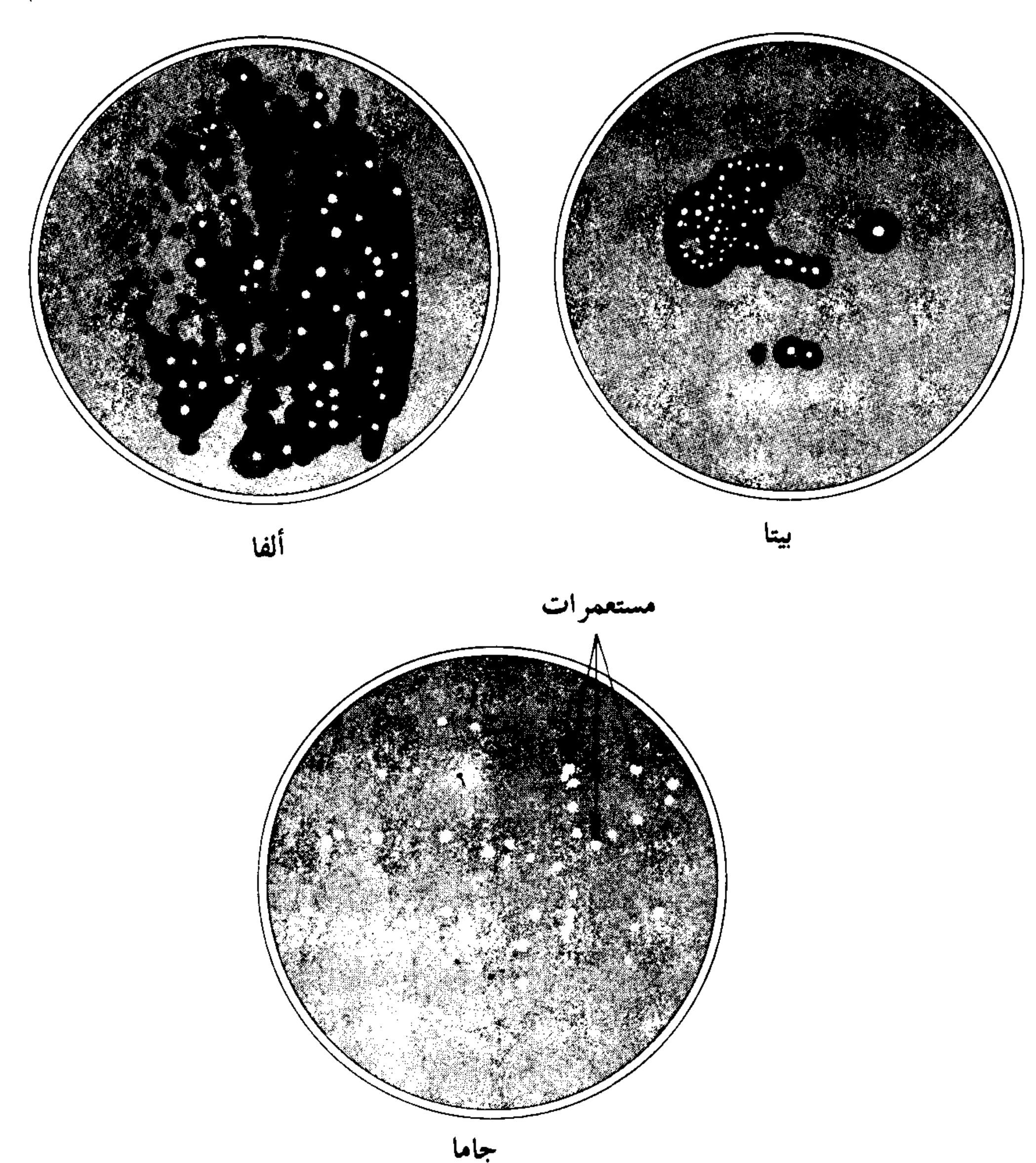
٨ ــ افحص الأطباق بالعين المجردة للمستعمرات المتكونة ، ولمناطق تحلل الهيم Hemolytic zones ، وافحص أيضا بالقوة الصغرى للميكروسكوب ، المستعمرات ، والمناطق المحيطة بها .

Reactions on Blood Agar التفاعلات على بيئة آجار الدم

تظهر الميكروبات المختلفة النامية فى بيئة آجار الدم تفاعلات مختلفة (انظر شكل ١) .

تحدث الميكروبات المحللة للهيم Hemolytic organisms تحللا للهيم Hemolysis ، ويسمى أيضا تحللا للهيم من نوع بيتا B-hemolysis . فى هذه الحالة تتكون منطقة zone تحيط بالمستعمرة ، تختلف فى قطرها من أقل من ١ مم إلى ٢ — ٣ سم . فى هذه المنطقة .. تتحلل كرات الدم الحمراء ، ويختفى اللون الأحمر . ويحدث هذا بسبب مواد نشطة محللة للهيم ، تسمى محللات الهيم Hemolysins ، تفرزها تلك الخلايا البكتيرية .

الميكروبات غير المحللة للهيم Non- hemolytic organisms لاتحدث تحللا للهيم ، ويسمى هذا التفاعل بتفاعل جاما reaction --γ ، حيث لا يظهر أى تأثير لخلايا البكتيريا النامية على كرات الدم الحمراء .



شكل (١) : تفاعلات البكتيريا على بيئة آجار الدم .

أنواع معينة من بكتيريا حمض اللاكتيك مثل :

Streptococcus pneumoniae and *Streptococcus mitis* تعطى لوناً أخضر ، يسمى تفاعل ألفا - α reaction ، ويحدث ذلك نتيجة تكون طبقة خضراء اللون greenish فى المنطقة المحيطة بالمستعمرة مصحوبا أحيانا بتحلل جزئى لكرات الدم الحمراء . يرتبط تفاعل الاخضرار greening بإنتاج خلايا البكتيريا لفوق أكسيد الأيدروجين .

أسئلة QUESTIONS

١ـــ لماذا لا يحدث تخثرا للدم المستخدم فى هذه التجربة قبل الاستعمال ؟

٢ ـــ ما هو الدم المنزوع منه الفيبرين defibrinated blood ؟ وما هو الدم المعامل بالسترات ، أو بالأكسالات ؟

٣ ـــ يجب أن يكون محتوى البيئة المستعملة للتعرف على تفاعلات الدم ، قليلاً من الكربوهيدرات القابلة للتخمر . أشرح ؟

تدريب (٧٦)

تعريف البكتيريا العنقودية المرضية

Identification of Pathogenic Staphylococci

يسبب النوع المحدث للمرض *Staphylococcus aureus* أمراضًا عديدة للإنسان ، تتضمن :

الدمامل carbuncles ، الخراريج furuncles ، خراريج الأنسجة الداخلية deep tissue abcesses ، عدوى الجروح wound infections ، التهاب الغشاء التيمورى للقلب pericarditis ، التهاب بطانة القلب الداخلية endocarditis ،. التهاب العظام osteomyelitis ، التهاب الغشاء السحائى meningitis ، والالتهاب الرئوى pneumonia ، وذلك بالاضافة إلى التسمم الغذائى food poisoning ، الذى تسببه أنواع من *Staphylococcus aureus* قادرة على إفراز توكسين معوى Enterotoxin .

يتطلب تعريف النوع المحدث للمرض من بكتيريا *Staphylococcus aureus* ، الكشف عن إنزيم الكوأجيولاز coagulase الذى يجلط فيبرين الدم clot blood fibrin ، والكشف عن إنزيم دى أوكسى ريبونيوكلياز deoxyribonuclease (DNase) ، وهو إنزيم ثابت للحرارة heat - stable ، يحلل الحمض النووى DNA . ورغم أن علاقة هذه الإنزيمات بالقدرة المرضية pathogenicity ـــ إن وجدت ـــ غير واضحة ، إلا أن وجود هذه الإنزيمات شديدة الارتباط بالقدرة المرضية لهذا الميكروب . وهذا التدريب سيوضح الطرق المستعملة للكشف عن نشاط هذه الإنزيمات .

اختبار إنزيم الكوأجيولاز Coagulase Test

من إحدى المشاكل الرئيسية المتعلقة ببكتريولوجيا الصحة العامة ، هو التفرقة بين الأنواع المرضية والمسببة للتسمم الغذائى ، وبين الأنواع غير المرضية للبكتيريا *Staphylococcus aureus* . والمتيسر عمله الآن فى المختبر ، هو إجراء اختبار إنزيم الكوأجيولاز على السلالات المفحوصة ، وذلك كوسيلة فعالة لتفرقة السلالات المرضية ، والمسببة للتسمم الغذائى عن غيرها من السلالات .

البكتيريا العنقودية الموجبة لاختبار الكوأجيولاز coagulase positive staphylococci ، هى تلك التى تكون جلطة clot من بلازما الدم العادى . وتكون الجلطة يعتبر اختبارا موجبا Positive test .

يُمنع الدم المستعمل فى الاختبار — وهو إما دم إنسان ، أو دم أرنب — من التجلط بإضافة محلول منظم للحموضة بالسترات ، أو الأكسالات ، أو الفيرسين versene ، ثم تفصل بالطرد المركزى كرات الدم الحمراء المعلقة بالمحلول ، وتستعمل البلازما الناتجة فى الاختبار . توجد بلازما مجففة فى أمبولات صغيرة من السهل الحصول عليها تجاريًا ، ويمكن استعمالها مباشرة بعد الإذابة فى الماء .

طريقة العمل PROCEDURE

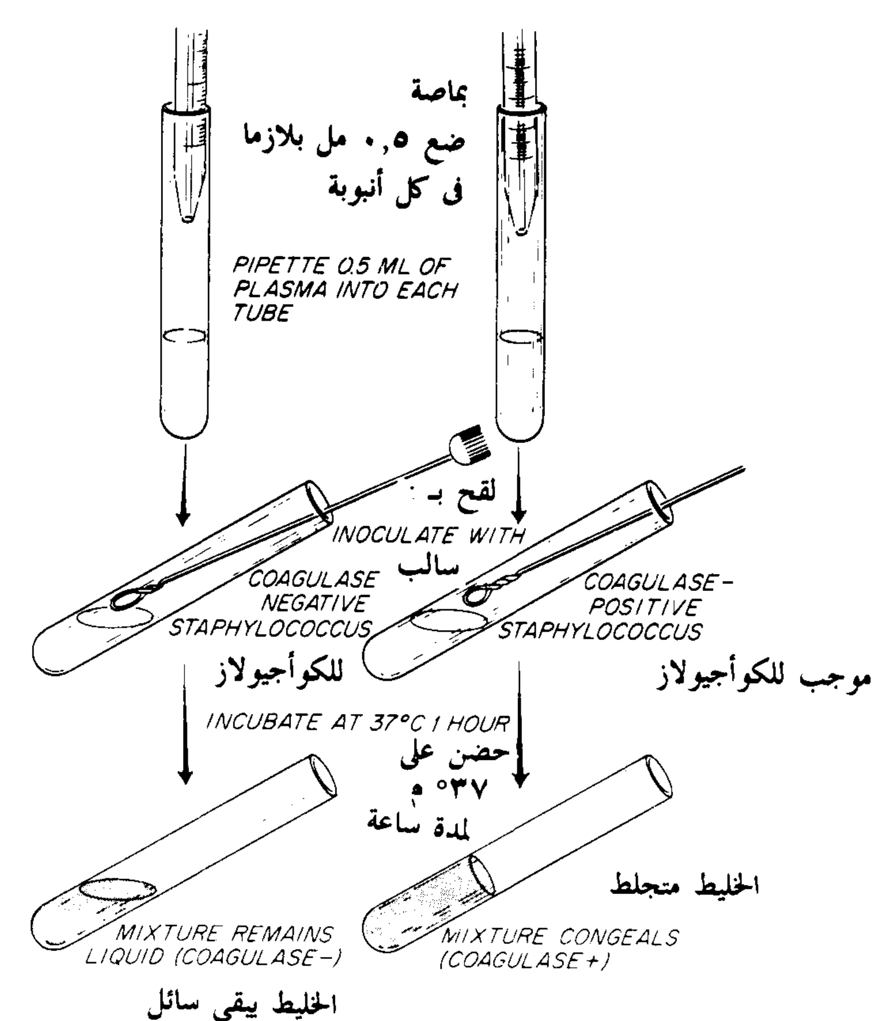
١ — ضف ٥ر٠ مل من البلازما المعاملة بالفيرسين ، إلى كل من أنبوبتى الاختبار الصغيرتين التى أمامك .

٢ — ضف إلى إحدى الأنابيب كمية كافية من خلايا مزرعة أ *Staphylococcus aureus culture* A لتكون معلقا عكر اللون . هذه الخلايا يمكن نقلها بغمسة إبرة من مستعمرة ، أو بإضافة ٢ نقطة من مزرعة عمرها ٢٤ ساعة نامية على بيئة مرق مستخلص الخميرة yeast-extract broth .

٣ — ضف إلى الأنبوبة الثانية خلايا مزرعة ب *Staphylococcus aureus* culture B .

٤ — حضن على درجة ٣٧° م لمدة ساعة واحدة ، وافحص للتجلط بإمالة الأنبوبة ، مع ملاحظة أن البلازما المجلطة لا تسيل — جدد المزرعة التى تحتوى على بكتيريا موجبة لاختبار الكوأجيولاز coagulase - positive *Staphylococcus* . شكل (١) يوضح خطوات إجراء اختبار إنزيم الكوأجيولاز .

سيجلط الميكروب الموجب لاختبار الكوأجيولاز الخليط المعد فى هذه الطريقة . فى بعض المزارع قد يحدث التجلط فى مدة أطول من ساعة . عموماً .. تعتبر المزرعة سالبة للكوأجيولاز ، إذا لم يتم التجلط بعد ٣ ساعات من التحضين .



شكل (١) : خطوات اختبار إنزيم الكوأجيولاز .

أثناء فحص المزارع المحضنة .. يراعى تداول الأنابيب باحتراس حتى لا تنكسر الجلطة المتكونة جزئيا .

اختبار إنزيم دى أوكسى ريبونيوكلياز الثابت للحرارة
Heat - Stable DNase Test

تنتج معظم سلالات البكتيريا العنقودية المرضية ، والمسببة للتسمم الغذائى ـــ بالإضافة إلى أنها تكون إنزيم الكوأجيولاز ـــ إنزيم نيوكلياز Nuclease الثابت للحرارة ، والذى يحلل الحمض النووى DNA .

للكشف عن وجود هذا الإنزيم ، يعرض آجار يحتوى على DNA مذاب ، وصبغة Toluidine Blue O ، لمزرعة سبق تسخينها من الميكروب المطلوب اختباره . إذا كان إنزيم النيوكلياز موجوداً ، فإن هالة وردية لامعة ستظهر فى الموضع الذى تحلل فيه الحمض DNA .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ـــ بماصة .. ضف بحرص ـــ٣,ـ مل من آجار منصهر يحتوى على DNA وتوليودين Toluidine blue DNA agar ، فوق سطح شريحة ، واتركه ليتجمد .

٢ ـــ باستعمال الطريقة التى سيشرحها مشرف العملى .. أعمل فى الآجار المتصلب عدد ٤ تجاويف متساوية ، وعلى مسافات منتظمة .

٣ ـــ ضع أنابيب مزرعة الميكروب أ ، ب فى حمام ماء يغلى لمدة ١٥ دقيقة ثم برد .

ملاحظة

يجهز من أنابيب المزارع مجموعتان ، مجموعة تعرض للغليان ، و المجموعة الثانية تترك بدون غليان .

٤ ـــ انقل غمسة إبرة من المزرعة أ غير المغلية إلى أحد التجاويف التى أعددتها فوق الشريحة . وأيضا أنقل غمسة إبرة من المزرعة ب غير المغلية إلى التجويف الثانى ، على أن تعقم الإبرة باللهب قبل وبعد النقل .

٥ ـــ كرر الخطوة رقم ٤ مستعملا المزارع المغلية ، مالئا بذلك التجويفين الأخيرين فوق الشريحة .

٦ ـــ حضن الشرائح على درجة ٣٧° م لمدة ٢ ساعة فى غرفة رطبة .

٧ ـــ افحص الشريحة لتكون حلقات وردية اللون لامعة حول التجاويف المحتوية على إنزيم النيوكلياز .

كلما أمكن .. فإنه ينصح بزيادة فترة التحضين للمزارع السالبة للاختبار إلى ٤ ساعات للكشف عن أى تفاعل موجب متأخر .

أسـئلة QUESTIONS

١ ـــ ما هو سيروم الدم ، وكيف يختلف عن البلازما ؟

٢ ـــ فى بعض الاختبارات .. لوحظ تكون تفاعل موجب كاذب لإنزيم الكوأجيولاز False positive coagulase ceat ، وذلك بالنسبة لأنواع البكتيريا القادرة على تمثيل السترات . اشرح ؟

٣ ـــ ما هى الخواص المزرعية ، والفسيولوجية الأخرى المميزة للبكتيريا العنقودية المرضية ؟

٤ ـــ ما هى الأغذية المعرضة عادة للتسمم بواسطة *Staphylococcus* ؟

٥ ـــ ما هو المصدر الأساسى للبكتيريا العنقودية التى تلوث هذه الأغذية ؟

٦ ــ هل كلا المزرعتين تنتجان إنزيم نيوكلياز ثابتًا للحرارة ؟
٧ ــ هل المجموعة التى تنتج إنزيم نيوكلياز ثابتًا للحرارة ، تعطى أيضا اختبارا موجبا لإنزيم الكوأجيولاز ؟
٨ ــ ما هى التغيرات الكيميائية التى تؤدى إلى تكون لون وردى حول المزارع الموجبة للنيوكلياز ؟

تدريب (٧٧)

اختبارات أقراص الحساسية للمضادات الحيوية المستعملة علاجيا – طريقة أقراص كيربى – باور

Sensitivity Discs in the Therapeutic Use of Antibiotics: Kirby-Bauer Technique

تعتبر طريقة أقراص الحساسية sensitivity-disc method لمعرفة أى من أنواع المضادات الحيوية المتعددة ذات تأثير فعال ضد ميكروب معين ، تعتبر وسيلة تشخيص سريعة ودقيقة وغير مكلفة ؛ فالمضادات الحيوية ذات المجال التأثيرى المتسع Broad spectrum ، تؤثر على أنواع متعددة من الميكروبات سواء الموجبة ، أو السالبة لجرام . ومع ذلك فهناك مضادات حيوية أخرى تثبط أنواعا أقل من الميكروبات . تختلف ميكانيكية تأثير المضاد الحيوى ضد الميكروبات ؛ فبعضها مثل : السالفانيلاميد يعمل كمشابه لمادة تدخل فى تركيب الخلية ، والبعض مثل : الستربتوميسين يثبط تمثيل البروتين بالميكروب .

أقراص ورق الترشيح Filter-paper discs المشبعة بمضادات حيوية مختلفة ، تستعمل فى المعمل in vitro لتقدير حساسية العزلات الأكلينيكية لتلك المضادات الحيوية . والمعلومات الخاصة بحساسية ميكروب مرضى للمضادات ، تساعد الطبيب على اختيار المضاد الحيوى المناسب لعلاج المريض التى أخذت منه عينات عزل الميكروبات .

إن السلالات المعزولة التى تقاوم مضادات عديدة ، آخذة فى الزيادة . وتتحكم فى تضاعف المقاومة بالميكروب ، الجينات المحمولة على بلازميدات ، والتى تنتقل من سلالة لأخرى بواسطة عوامل نقل المقاومة Resistance transfer factors . وهكذا .. فبالإضافة إلى الاستفادة من المعلومات الخاصة بحساسية عزلة أكلينيكية لمضادات معينة ، فإن الطبيب سيعرف نظام مقاومة الدواء من عزلة ما ، Antibiogram ، وهى وسيلة مفيدة من الناحية الوبائية ، لتتبع حدوث وباء بسبب ميكروب معين .

لاختبار استجابة ميكروب معين للتأثر بالمضادات الحيوية .. توضع الأقراص المشبعة بالمضادات على سطح طبق آجار ملقح بالميكروب المطلوب اختباره . أثناء التحضين ينمو الميكروب ، ولكن تتكون مناطق خالية من النمو حول الأقراص المحتوية على المضادات التى تثبط النمو . يرتبط قطر منطقة التضاد على الآجار zone of inhibition — وهى منطقة خالية من نمو الميكروب — الناتجة من انتشار diffusion المضاد الحيوى فى الآجار ، مباشرة بمدى استجابة الميكروب للتأثر بالمضاد . وتتأثر منطقة التضاد بمجموعة من العوامل المتغيرة ، تتضمن : حجم اللقاح ، ودرجة حرارة التحضين ، ومدة التحضين ، وتركيب البيئة ، والرقم الأيدروجينى ، وغازات الجو المحيط ، وثبات المضاد ، وعوامل أخرى . ويقلل الاستخدام الدقيق لطريقة قياسية ، من تأثير تلك المتغيرات عند إجراء التقدير .

من الأهمية بمكان .. أن تؤخذ العينة من مجموعة مستعمرات بالمزرعة ، لتجنب الانتخاب بالصدفة للسلالات التى فقدت المقاومة ، كما أن كمية اللقاح النهائية يجب أن تكون كبيرة لتزيد من إمكانية اكتشاف طفرة مقاومة .

يجب استعمال السلالات المعَرّفة من American Type Culture Collection ، وذلك بشكل روتينى أثناء إجراء الاختبار للتأكد من أن كل الظروف المتغيرة فى طريقة العمل متحكم فيها ، وبذا تكون النتائج قابلة للتطبيق .

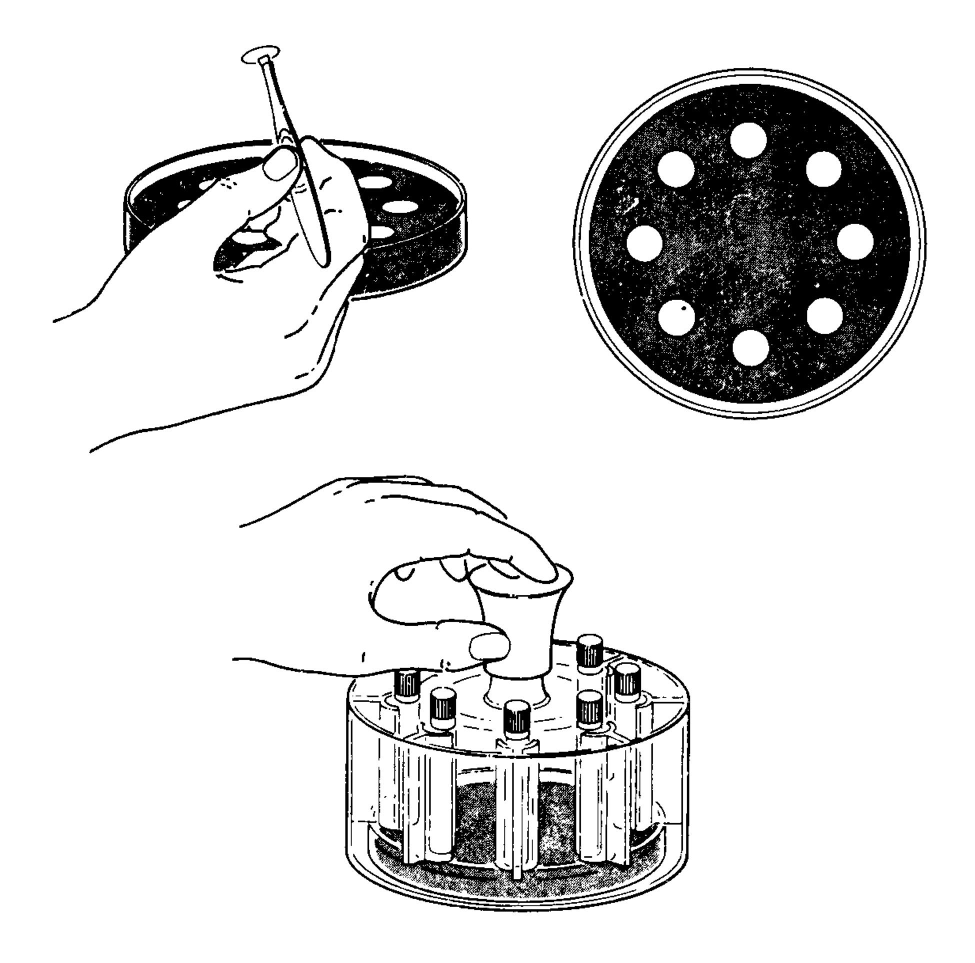
يوضح التدريب التالى الاختلافات فى حساسية البكتيريا الموجبة ، والسالبة لجرام ، لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية . وستقوم بتقدير حساسية المضاد لمجموعة واحدة من البكتيريا . بعض الطلاب سيختبرون أنواعا من بكتيريا سالبة لجرام ، والبعض الآخر سيختبرون أنواعًا من بكتيريا موجبة لجرام .

طريقة العمل PROCEDURE

١ — اغمس مرود المسح (المسّاحة) swab المعقم ، فى مزرعة بويون لبكتيريا ذات كثافة عددية قياسية Standard density . لف المرود عدة مرات مع حك جدران الأنبوبة من الداخل فوق سطح السائل لإزالة اللقاح الزائد .

٢ — خطط بالمسّاحة كل سطح طبق آجار مولر — هنتون Mueller-Hinton . كرر التخطيط مرتين مع لف الطبق حوالى ٦٠ درجة عند كل تخطيط لضمان انتظام توزيع اللقاح .
ضع غطاء الطبق مكانه فوق قاعدة الطبق . اترك الطبق من (٣ — ١٥) دقيقة حتى تُمتص رطوبة السطح الزائدة .

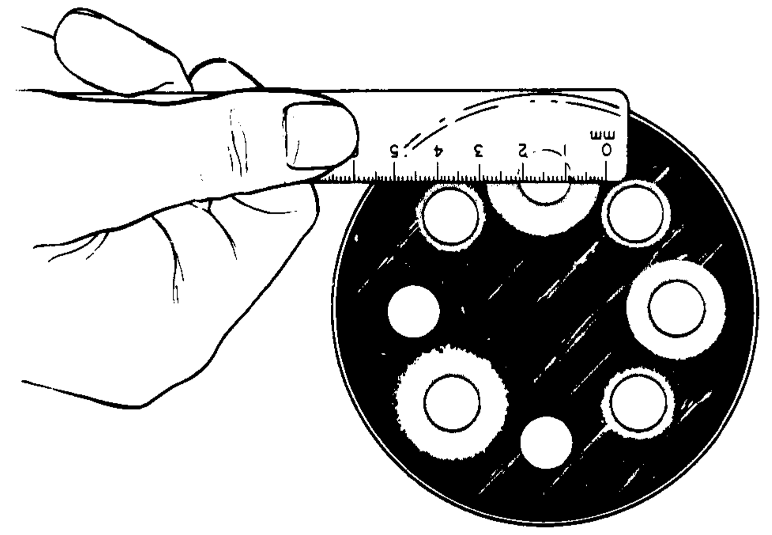
٣ — باستعمال ملقط معقم (أو موزع dispenser) .. ضع الأقراص على سطح الآجار . وزع الأقراص بانتظام ، وبحرص اضغط على القرص لأسفل لضمان الالتصاق الكامل بسطح الآجار (انظر شكل ١) .



شكل (١) : وضع أقراص المضادات بالملقط ، أو بالموزع على سطح مزرعة الاختبار .

٤ ــ فى خلال ١٥ دقيقة من وضع الأقراص .. حضن الأطباق على درجة ٣٧°م .

٥ ــ بعد (١٦ ــ ١٨) ساعة من التحضين ، افحص كل طبق ، قس قطر منطقة التضاد الكاملة باستعمال مسطرة وسجل النتائج (انظر شكل ٢) .

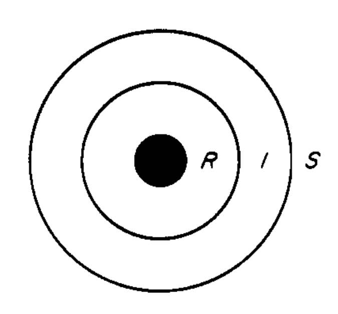


شكل (٢) : مناطق التضاد (الخالية من النمو) بسبب المضادات الحيوية .

٦ ـــ فسر نتائج منطقة التضاد التى حصلت عليها بالرجوع إلى الجداول الخاصة (جداول بها مناطق قياسية للمضادات الحيوية المختلفة) .

اذكر فى تقريرك هل الميكروب المختبر حساس susceptible ، أو متوسط الحساسية Intermediate ، أو مقاوم resistant وذلك بالنسبة للمضادات الحيوية المختلفة المستعملة (انظر شكل ٣) .

٧ ـــ خذ طبق زميلك الخاص بالميكروب الثانى ، قس منطقة التضاد ، وقدر استجابة الميكروب للمضادات الحيوية المختلفة .



تفسير نتائج قطر منطقة التضاد

R : مقاوم Resistant : قطر منطقة التضاد يساوى (أو أقل من) قطر الدائرة الداخلية .

I : متوسط الحساسية Intermediate : قطر منطقة التضاد أكبر من R لكن أقل من قطر الدائرة الخارجية .

S : حساس Sensitive : قطر منطقة التضاد أكبر من الدائرة الخارجية .

شكل (٣) : تفسير نتائج قطر منطقة التضاد الناتجة من تأثير المضادات الحيوية . تختلف أقطار منطقة التضاد باختلاف الميكروب المختبر ونوع المضاد المستعمل .

سيزودك مشرف العملى ببيانات قطر منطقة التضاد الخاصة بالمضاد الحيوى المختبر .

طرق اختبار الجودة Quality - Control Procedures

فى هذا التدريب سيقوم مشرف الدرس العملى باستعمال مزارع **ATCC cultures** *S. aureus, E. coli and P. aeruginosa* متبعا نفس طرق وخطوات العمل التى استعملتها .

ستعلن نتائج اختبار الجودة Control test بالمعمل حتى تتمكن من تفسير نتائجك .

اسئلة QUESTIONS

١ ـــ لماذا تنمو بعض المستعمرات داخل منطقة التضاد ؟

٢ ــ هل تتساوى جميع المضادات الحيوية فى تأثيرها ضد كل من الميكروبات الموجبة والميكروبات السالبة لجرام ؟

٣ ــ كيف يمكنك أن تعرف إن كان المضاد مثبطا أو قاتلا للميكروبات ؟

٤ ــ لا تضمن نتائج الاختبارات المعملية النجاح فى التطبيق الإكلينيكى ، لماذا ؟

٥ ــ هل تتفاعل كل سلالات النوع الميكروبى الواحد بنفس الطريقة تجاه المضادات الحيوية ؟ (نعم / لا) ولماذا ؟

٦ ــ كيف تستعمل المضادات الحيوية لأغراض أخرى خلاف العلاج من الأمراض ؟

تدريب (٧٨)

التعرف على افتراضات كوخ

Demonstration of Koch's Postulates*

تعتبر افتراضات كوخ Koch's postulates حجر الأساس فى الميكروبيولوجيا الطبية ، فهى تمكننا من إثبات أن ميكروبا معينا هو العامل المسبب Causative لمرض معين .

وتتلخص هذه الافتراضات فيما يلى :

١ ــ يوجد الميكروب ، دائما وبصفة منتظمة ، مرتبطا بالمرض المعين .

٢ ــ يمكن عزل الميكروب فى مرزعة نقية على البيئات المعملية ، أو بالعائل المناسب إذا كان الميكروب حتمى التطفل(**) .

٣ ــ حقن هذا الميكروب فى حيوان التجارب ، يسبب مرضا مشابها للمرض الأصلى .

٤ ــ يمكن عزل الميكروب من حيوان التجارب الذى حدث به المرض نتيجة الحقن بالميكروب .

(*) هذا التدريب مأخوذ من :

Infection of goldfish with *Vibrio anguillarium* by W.W. Umbreit and E.J.Ordal, ASM News 38 (Feb.1972), 93-98- Permission for its use was granted by the American Society for Microbiology.

(**) المترجمان

فى هذا التدريب ... ستعطى الفرصة لعزل الميكروب من سمك المرجان goldfish المصاب ، وستطبق افتراضات كوخ لمعرفة أن هذا الميكروب هو سبب المرض .

بالإضافة إلى ما سبق ... فإنك ستقدر حساسية المضاد الحيوى للميكروب المرضى المعزول ، وذلك بهدف معرفة خواص الميكروب المسبب للمرض ، ومعرفة المضاد الحيوى المؤثر ضد هذا الميكروب لحماية سمك المرجان .

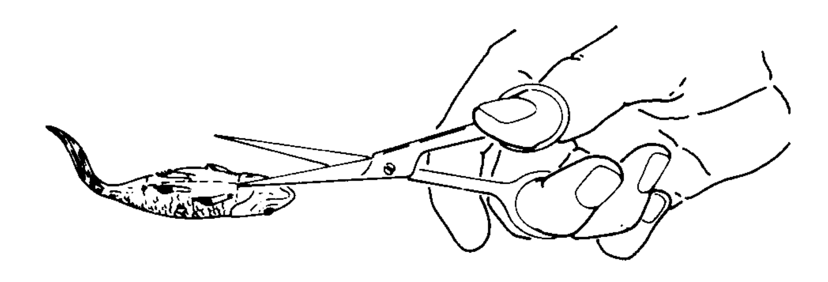
طريقة العمل PROCEDURE

سيعمل الطلبة فى مجاميع ، كل مجموعة من ثلاثة طلاب أو أكثر ، ستأخذ كل مجموعة طلاب سمكة مرجان ميتة ، وسبب الموت هو الاصابة ببكتيريا *Vibrio anguillariun* .

١ — ضع السمكة الميتة على ورق نشاف مشبع بمحلول ١٪ فينول (أو أى مبيد ميكروبى آخر) .

بمقص صغير معقم بالإيثانول أو الماء المغلى .. شق بطن السمكة طوليا من أول الخياشيم حتى فتحة الإخراج . اعمل عدة قطاعات رأسية vertical cuts ، من هذا الشق إلى سلسلة الظهر ، ابتداء من خلف الخياشيم مباشرة وحتى بداية منطقة الذيل (أنظر شكل ١) . حاذر من جرح أو قطع القناة الهضمية .

بملقط معقم .. افتح السمكة التى شرحتها لتظهر الأعضاء الداخلية .

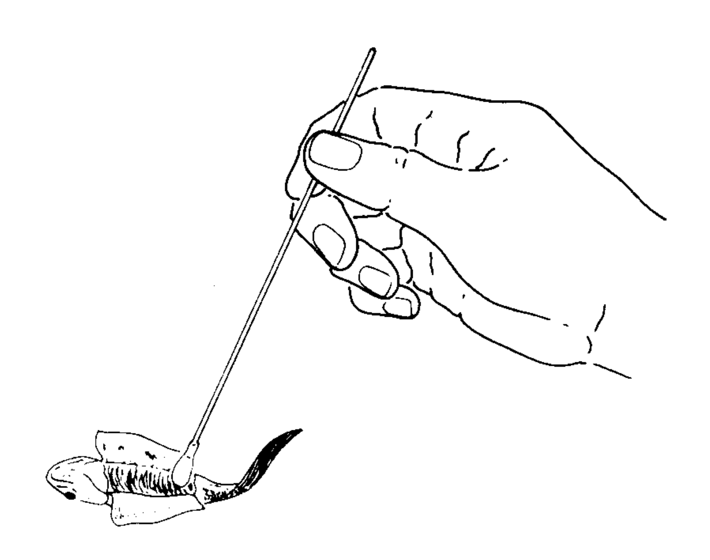


شكل (١) : تشريح سمك المرجان الميت .

٢ — ضع مساحة (مردود مسح) swab معقمة فى التجويف البريتونى peritoneal cavity ، ثم استعمل المساحة لتخطيط ٢ طبق بترى ، بها بيئة آجار مستخلص المخ والقلب Brain-heart infusion agar المحتوية على ٥ر١٪ ملح و ٥ر٠٪ نشا (انظر شكل ٢) . يخطط الطبق الأول بغزارة من ٢ إلى ٥ اتجاهات . على سطح هذا الطبق ضع سلسلة من أقراص المضادات الحيوية (تدريب ٧٧) لمعرفة حساسية المضاد لميكروبات الأحشاء .

باستعمال إبرة تلقيح .. خطط الطبق الثانى (لبيئة آجار مستخلص المخ والقلب المحتوية على الملح والنشا ، للحصول على مستعمرات متباعدة منعزلة .

حضن أطباق الآجار على درجة ٣٠° م لمدة ٢٤ ــ ٤٨ ساعة . جهز أيضا شرائح مصبوغة بصبغة جرام لميكروبات سوائل التجويف البريتونى . افحص الشرائح .



شكل (٢) : عمل مسحة من إفرازات التجويف البريتونى

٣ ــ بعد التحضين .. سجل ما تلاحظه عن حساسية المضادات الحيوية للعزلات .

٤ ــ من عدة مستعمرات منعزلة نامية على الأطباق المخطوطة ، جهز أغشية مصبوغة بصبغة جرام واجر اختبار الأكسيديز (تدريب ٤٠) .

من مستعمرة موجبة لاختبار الأكسيديز ، سالبة لجرام ، عصوية منحنية .. لقح أنبوبة ذات غطاء محو لمرق مستخلص المخ والقلب المحتوى على ٥ر١٪ كلوريد صوديوم .

وأخيرا .. اغمر الأطباق بمحلول يود صبغة جرام gram's iodine ، لمعرفة إذا كانت المستعمرات التى فحصتها قادرة على تحليل النشا (تدريب ٣٤) .

حضن أنبوبة مرق المخ والقلب على درجة ٣٠° م لمدة ٤٨ ساعة على حاضن أنابيب هزاز tube shaker .

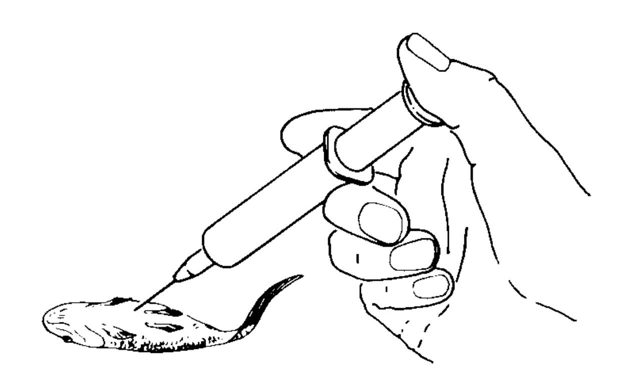
٥ ــ فى الدرس العملى التالى .. سيعطى لكل مجموعة طلاب ثلاث سمكات مرجان حية ، اثنان منها فى كأس به ماء ، والثالثة فى كأس به محلول يحتوى على ١٠٠ ميكروجرام / مل من التتراسيكلين . بمحقن تحت الجلد معقم ، سعته ، ١ مل ، احقن ٠,١ مل مزرعة مرق مستخلص المخ والقلب فى التجويف البريتونى لإحدى السمكات التى بكأس الماء ، وأيضا للسمكة التى بكأس محلول المضاد الحيوى . احقن السمكة الثانية التى بكأس الماء بـ ١ر٠

مل محلول ملحى معقم . لإجراء عمليات الحقن ، يتداول السمك بمنشفة رطبة ، لمنع الإصابات .. اقبض على السمكة من ظهرها . أحقن أمام الزعنفة البطنية ventral fin أو خلفها تماما (أنظر شكل ٣) .

ارجع كل سمكة للكأس الخاص بها . حضن السمك وهو فى الكأس على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ــ ٤٨ ساعة .

تحذير : لا تترك السمك خارج الماء لأكثر من ٥ دقائق .

٦ ــ بعد التحضين .. ارفع أى سمك ميت وقم بتشريحه (أو ضعه فى الثلاجة لحين تشريحه) .



شكل (٣) : حقن سمك المرجان بالمزرعة

خطط من الإفرازات البريتونية على أطباق آجار مستخلص المخ والقلب المحتوى على الملح والنشا ، وافحص العزلات كما هو موضح فى الخطوات رقم ٢، ٣، ٤، للشكل المورفولوجى وتفاعل جرام وتفاعلات الأكسيديز والنشا وحساسية المضادات .

٧ ــ قارن صفات العزلات المأخوذة من السمك الأصلى الميت ، بصفات العزلات التى أخذتها من السمك الذى حقنته .

QUESTIONS أسئلة

١ ــ هل *Vibrio anguillarium* بكتيريا مرضية هامة ؟

٢ ــ كيف تستطيع أن تبين إذا ما كان السم البكتيرى هو الذى سبب موت السمك أم لا ؟

تدريب (٧٩)

الإلتقام Phagocytosis

عندما يغزو جسم دقيق غريب مثل خلية البكتيريا سيروم الدم أو نسيجًا ، فإن خلايا لاقمة phagocytic cells تظهر مكان الإصابة ، وهذه الخلايا اللاقمة ينتجها الحيوان ، وتعمل على تحطيم الجسيمات الغازية فى عملية تعرف باسم الالتقام phagocytosis .

يوجد نوعان أساسيان من الخلايا اللاقمة وهما : خلايا الدم البيضاء المتعددة الأشكال والأنوية polymorphonuclear leucocytes (PML) التى توجد فى الدم ، وخلايا اللاقمات الكبيرة Macrophages ، التى يوجد بعضها مثبتًا فى بعض الأنسجة الضامة وفى الطحال spleen .

بالنسبة للتدريبات التالية .. فقد قام مشرف العملى بتحضير خلايا لاقمة ، من حيوان محصن مناعيا immune animal وخلطها بخلايا البكتيريا . هذه الخلايا البكتيرية من نفس النوع المحقون فى الحيوان ليصبح مناعيًّا ، أى لتنشيط أجهزته الدفاعية . تم تحضين خليط البكتيريا والخلايا اللاقمة لمدة ٦٠ دقيقة ، وهى المدة التى يحدث خلالها الالتقام . وقد عرضت أجزاء من الخليط للطرد المركزى على فترات ١٥، ٣٠، ٦٠ دقيقة من بدء عملية الخلط .

ستفحص عينتان ، واحدة تم تحضيرها من الحيوان المحصن مناعيا وسيظهر بها الالتقام ، والعينة الثانية للمقارنة .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ حضر أغشية شرائح smear slides من العينتين أ ، ب التى أمامك .

٢ ــ اصبغ الأغشية بصبغة رايت Wright's stain كما يلى :

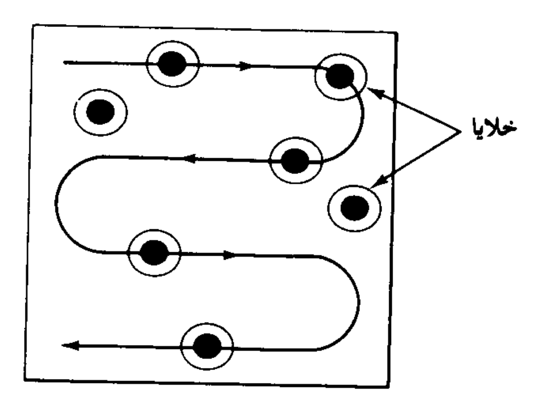
(أ) جفف الغشاء هوائيا واغمر الشريحة بصبغة رايت لمدة ٢ دقيقة .

(ب) ضف ماء مقطر للشريحة بدون إزالة للصبغة .

(جـ) أترك الشريحة مكانها لمدة ٤ دقائق .

(د) أغسل بالماء المقطر وجفف هوائيا .

٣ ــ بواسطة العدسة الزيتية .. قدر بكل شريحة عدد الميكروبات الموجودة بداخل عشرين خلية من خلايا PML ، أو بخلايا اللاقمات الكبيرة ، مستعملا طريقة العد الموضحة (بشكل ١) .



شكل (١) : خط مسار عد الخلايا لتقدير الخلايا على الشريحة .

٤ ــ احسب معامل الالتقام Phagocytic index ، وهو عبارة عن متوسط عدد الخلايا البكتيرية التى التقمت engulfed (الموجودة بالداخل) لكل خلية ملتقمة phagocyte .

اسئلة QUESTIONS

١ ــ ما هى العينة التى تم تحضيرها مع السيروم المناعى ؟

٢ ــ ما هو الأبسونين Opsonin* ؟

٣ ــ ما هو نوع الخلايا الملتقمة التى شوهدت فى هذا التدريب ؟

٤ ــ ماذا يحدث لو زرعت عينات أ ، ب بطريقة الأطباق الكمية ؟

٥ ــ كيف تُقتل البكتيريا بواسطة الخلايا اللاقمة ؟

تدريب (٨٠)

اختبار التجمع على الشريحة

Slide Agglutination Test

يمكن قياس تفاعلات الأنتجن مع الجسم المضاد antigen- antibody reactions بطرق متعددة . فى بعض الحالات التى يمكن فيها تطبيق اختبار التجمع على الشريحة .. يكون هذا الاختبار مفيدا وسريعا كطريقة تستخدم لملاحظة تفاعل الأنتجن مع الجسم المضاد .

بعض البكتيريا ، مثل *Salmonella* ، يمكن تعريفها بواسطة اختبار التجمع ، باستخدام سيروم خاص معروف متخصص . يحضر هذا السيروم بحقن الأنتجن (نوع من جنس السالمونيلا) فى أرنب ، فيؤدى ذلك إلى تكوين أجسام مضادة antibodies متخصصة لانتيجينات سطح السالمونيلا .

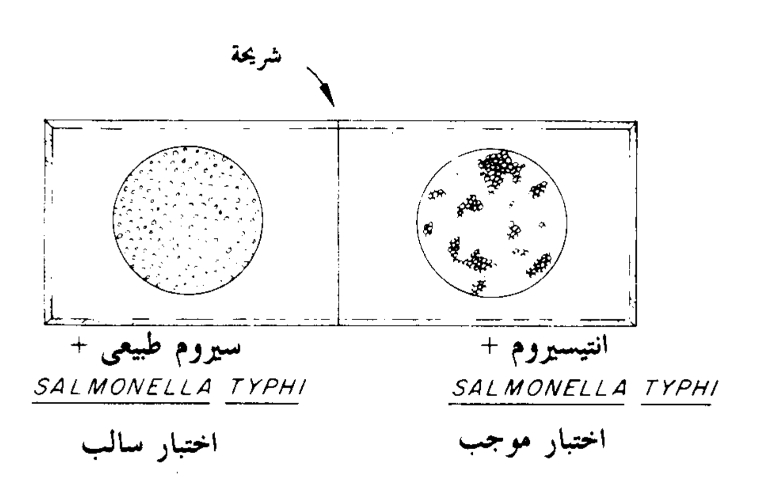
(*) جسم مضاد بالدم يساعد الخلايا اللاقمة على زيادة معدل التهامها للبكتيريا المهاجمة . (المترجمان) .

ومن جهة أخرى .. فإنه باستخدام مزرعة معروفة ، فإننا نستطيع الكشف عن الأجسام المضادة للميكروب ، الموجودة بالسيروم . ففى اختبار فيدال Widal test لتشخيص الحمى التيفودية .. تستعمل مزرعة من *Salmonella typhi* ، ثم نطبق اختبار التجمع للكشف عن وجود الأجسام المضادة للميكروب ، الموجودة بدم المريض المشتبه فى إصابته بالحمى التيفودية .

فى هذه الطريقة من التشخيص .. تخلط خلايا البكتيريا بسيروم المريض وتفحص للتجمع . إذا حدث تجمع ، فمعنى ذلك أن سيروم دم المريض يحتوى على أجسام مضادة ، ويحتمل أن يكون مصابا بالتيفود ـــ أو يكون محصنا بالفاكسين vaccinated ، وبذلك يكون مريضا بسبب آخر .

عند استعمال اختبار التجمع لأى من الغرضين ـــ أى لتعريف خلايا البكتيريا أو الأجسام المضادة بالسيروم ـــ فإن نظام الاختبار يتضمن وجود الأنتجن (خلايا البكتيريا) ، والأجسام المضادة (موجودة بالسيروم) ، ومادة إليكتروليتية ، عادة ٨٥ر٪ كلوريد صوديوم ، التى يعلق فيها الأنتجن . إذا خلطت معا ، الخلايا بالسيروم المتخصص لها ، على شريحة ، فإن الخلايا تتجمع معا وتظهر بشكل محبب granular ، ويعتبر هذا اختبار تجمع موجب positive agglutination test . فى الاختبار السالب لا يحدث تجمع ، وتبقى الخلايا متباعدة منتظمة التوزيع (انظر شكل ١) .

تجمع الخلايا فى سيروم متخصص ، يتم نتيجة لربط الخلايا ببعضها بروابط من الأجسام المضادة لتكون تجمعات أكبر وأكبر .



شكل (١) : اختبار التجمع على الشريحة .

فى هذا التدريب .. ستختبر سيروم الدجاج chicken sera لوجود أجسام مضادة لبكتريا *Salmonella pullorum* المسبب للإسهال الأبيض Pullorum or white diarrhea بالطيور الداجنة . وهو مرض خطير ، يمكن أن يقضى على القطيع مسببا خسائر اقتصادية كبيرة . بإجراء اختبار التجمع .. فإنه يمكن التعرف على الطيور الحاملة للميكروب carriers ، وإبعادها عن القطيع .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ بالقلم الشمع .. إرسم دائرتين ، كلًّا فى حجم القرش تقريبا ، على سطح شريحة زجاجية نظيفة .

٢ ــ فى إحدى الدوائر .. ضع غمسة كبيرة من سيروم أ ، وهذا قد يكون موجبا أو سالبا لمرض الإسهال الأبيض .

٣ ــ فى الدائرة الثانية .. ضع غمسة كبيرة من سيروم ب .

٤ ــ ضف نقطة من معلق خلايا بكتيريا *S. pullorum* بكل دائرة . إضافة المعلق تكون بكمية كافية لتكوين تعكيرا واضحًا .

٥ ــ امزج محتوى كل دائرة باستعمال عصى خشبية نظيفة wooden sticks .

٦ ــ اكمل الخلط بإمالة الشريحة بحيث يدور الخليط فى مدارات دائرية داخل الدائرة المرسومة بالقلم الشمع .

٧ ــ افحص الشرائح لوجود تجمع .

ملاحظة

قد تصبغ التحضيرات التجارية المتوفرة لمعلق *S.pullorum* ، باللون الأحمر أو بأى لون آخر ، لتسهيل الفحص .

اسئلة QUESTIONS

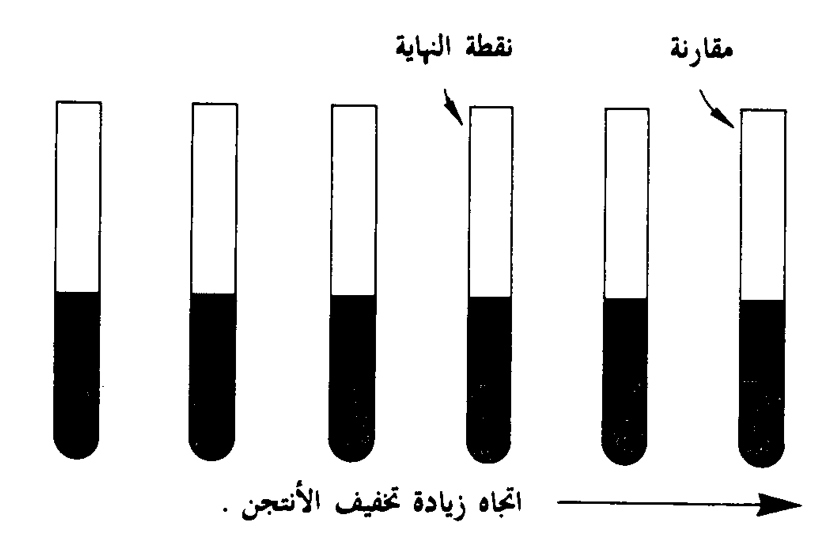
١ ــ ما هى الأمراض الأخرى التى تصيب الانسان أو الحيوانات ، والتى يمكن التعرف عليها بطريقة اختبار التجمع ؟

٢ ــ كيف يمكن لجرعة من عامل مناعى booster-shot أن تحافظ على المناعة ضد مرض معين ؟

تدريب (٨١)

اختبار الترسيب Precipitin Test

يختلف تفاعل الترسيب Precipitin reaction عن تفاعل التجمع الذى درس فى التدريب السابق . ففى التجمع .. نجد أن الأنتجينات عبارة عن جزء من التركيب الكامل للخلايا ، وتتفاعل معها الأجسام المضادة المتخصصة ، فيحدث تجمع للخلايا . أما فى تفاعل الترسيب .. فإن الأنتجن الذائب soluble antigen يتفاعل مع الجسم المضاد المتخصص له ليكون راسبا precipitate يمكن رؤيته (انظر شكل ١) .



شكل (١) : اختبار حلقة الترسيب .

فى أبسط اختبارات الترسيب ، المسمى باختبار حلقة الترسيب Precipitin ring test ، فإن جزءا صغيرا من الأنتجن يوضع بعناية فى أنبوبة فى شكل طبقة ، تليها طبقة من محلول سيروم يحتوى على الأجسام المضادة . إذا كان كل من الأنتجن والجسم المضاد متشابهين Homologous ؛ أى أن كلا منهما متخصص للآخر — فإن راسبا — أو حلقة — تتكون فى منطقة التقابل نتيجة انتشار كل من المادتين فى الأخرى .

ويمكن أيضا إجراء اختبار الترسيب فى أنابيب شعرية للتوفير من مواد التفاعل المرتفعة الثمن . وعند استعمال طريقة الأنابيب الشعرية .. يسحب أولا السيروم المضاد (وهو سيروم يحتوى على أجسام مضادة) — الأنتيسيروم Antiserum — يسحب بالأنبوبة الشعرية حتى يتجمع فى طبقة فوق مستخلص الأنتجن .

فى هذا التدريب .. ستقوم بعمل اختبار حلقة الترسيب باستعمال سيروم الحصان كأنتجن ، وانتيسيروم الأرنب الذى يحتوى على أجسام مضادة متخصصة .

طريقة العمل PROCEDURE

إن أنتجن أ الذى ستستعمله مخفف ١٠/١ ، والأجسام المضادة مخففة ٢/١ .

١ — اعمل ٤ تخفيفات عشرية متسلسلة للأنتجن أ ، بنقل ١ر٠ مل من الأنتجن لأنبوبة اختبار بها ٩ر٠ مل محلول ملحى ، اخلط جيدا بماصة نظيفة . ثم انقل ١ر٠ مل من هذا التخفيف إلى الأنبوبة الثانية المحتوية على ٩ر٠ مل محلول ملحى .. وهكذا .

بذلك سيكون لديك تخفيفات $١٠^{-١}$ ، $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ ، $١٠^{-٤}$ ، $١٠^{-٥}$.

٢ — باستعمال ماصة باستير ، انقل تخفيفات الأنتجن الخمسة إلى خمس أنابيب ترسيب محتوية على السيروم المضاد . ضع الأنتجن بعمق ٤ مم ليكون طبقة فوق الأنتيسيروم . يمكن استعمال نفس الماصة إذا نقلت أولا التخفيف الأعلى ، والتخفيف الأقل أخيرا .

باستعمال ماصة باستير نظيفة انقل سيروم المقارنة لأنبوبة الترسيب السادسة .

ملاحظة : يجب إضافة كل محاليل الأنتجن بعناية ، بسكبها على جانب الأنبوبة لمنع خلطها بالسيروم . رقّم الأنابيب وأطمرها فى قالب من الطمى modeling clay .

٣ — أفحص الأنابيب لتكون مناطق ترسيب بعد ١ ، ٥ ، ١٠ ، ٣٠ دقيقة . سجل أعلى تخفيف من الأنتجن أعطى منطقة ترسيب .

هذا الاختبار إثبات نوعى qualitative لتفاعل الأنتجن مع الجسم المضاد ، وكذلك للعلاقات الكمية المحدودة limited quantitative relationships . ونظرا لأن تركيز الانتيسيروم ثابت فى الاختبار .. فإن كمية الراسب Precipitin content بالسيروم ؛ أى درجة تركيزه ، يمكن أن يعبر عنها بمقلوب أكبر تخفيف من الأنتجن أعطى راسبا .

اسئلة QUESTIONS

١ — ما هو تركيز الأنتجن Antigen titre الذى اختبرته ؟

٢ — ما هى الطرق الأخرى التى يمكن استخدامها لإجراء اختبارات الترسيب ؟

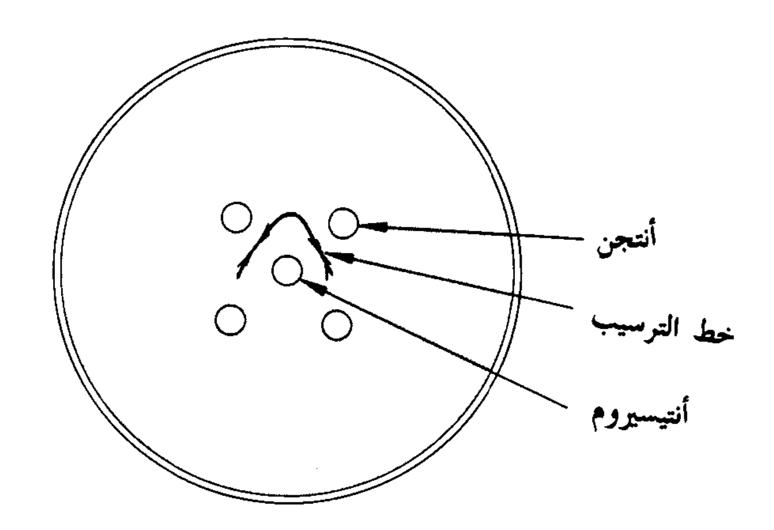
تدريب (٨٢)

طريقة الانتشار المناعى : طبق أوكترلونى

Immunodiffusion: Ouchterlony Plate

يمكن استعمال الجل gel لدراسة تفاعل الترسيب ، عندما يوضع الأنتجن والجسم المضاد له فى مساحات متجاورة على جل (مثل طبق آجار) ، فإن كلًا منهما ينتشر diffuse فى الآخر ، ويحدث تفاعل ترسيب يمكن رؤيته كمنطقة معتمة .

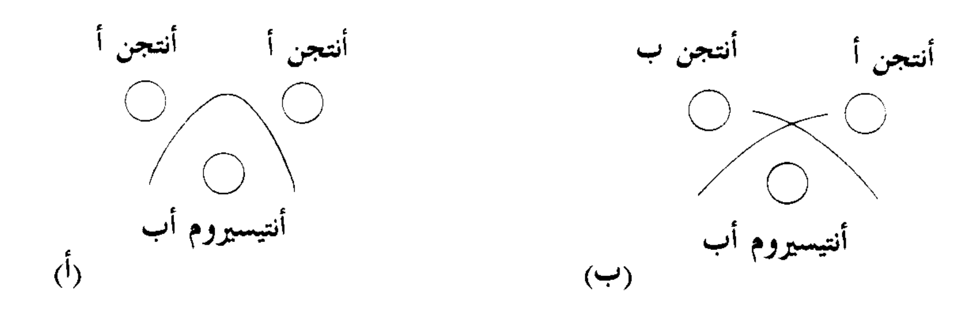
تعتبر طريقة أوكترلونى من أكثر طرق الانتشار المناعى immunodiffusion technique استعمالا . فى هذه الطريقة .. يوضع الأنتيسيروم فى تجويف يحفر بمركز طبق آجار نقى ، وتوضع الأنتيجينات الذائبة فى سلسلة تجاويف حول محيط طبق الآجار . إذا كانت الأجسام المضادة الموجودة بالسيروم متخصصة للأنتيجينات المختبرة ، فإن خطًا معتمًا (أو خطوطًا) من الراسب تتكون بالآجار ، بين التجاويف المحتوية على الأنتجن والسيروم المضاد (انظر شكل ١) .

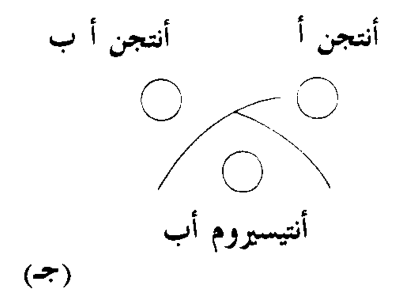


شكل (١) : تكوين الراسب بين الأنتجن والأنتيسروم المتخصصين .

يعتمد الوقت اللازم لتكون هذه الخطوط على تركيز titre كل من الأنتجن والجسم المضاد ، وبالتالى يعتبر مقياسًا . بملاحظة خطوط الترسيب .. فإنه يمكن معرفة إذا كانت الأنتيجينات المختلفة ذات مكونات أنتجينية مشتركة أم لا . وكما هو موضح بشكل (٢ — أ) .. فإنه إذا كانت الأنتجينات المتشابهة فى التركيب فى تجاويف متقاربة مع السيروم المضاد الذى بالتجويف المركزى ، فإن خطوط الترسيب المتكونة ، تتصل ببعضها لتكون خطا واحدا مستمرا .

إذا استعمل اثنان من الأنتيجينات المختلفة فى المكونات الأنتيجينية .. فإن الخطين المتكونين يكونان غير مرتبطين ، متقاطعين ، وهما نتوين double spur (انظر شكل ٢ — ب) .





شكل (٢) :

أنواع الترسيب فى أطباق أوكترلونى Ouchterlony .
(أ) تفاعل يمكن تعريفه .
(ب) تفاعل غير ممكن تعريفه .
(جـ) تفاعل يمكن تعريفه جزئيا .

إذا استعمل اثنان من الأنتيجينات ، يشتركان فى بعض المكونات ويختلفان فى البعض الآخر ، فإن التفاعل يعطى خطين متقاطعين ، ولكن لهما نتوءاً واحداً one spur يمتد نحو الأنتجن الأضعف (انظر شكل ٢ ــ جـ) .

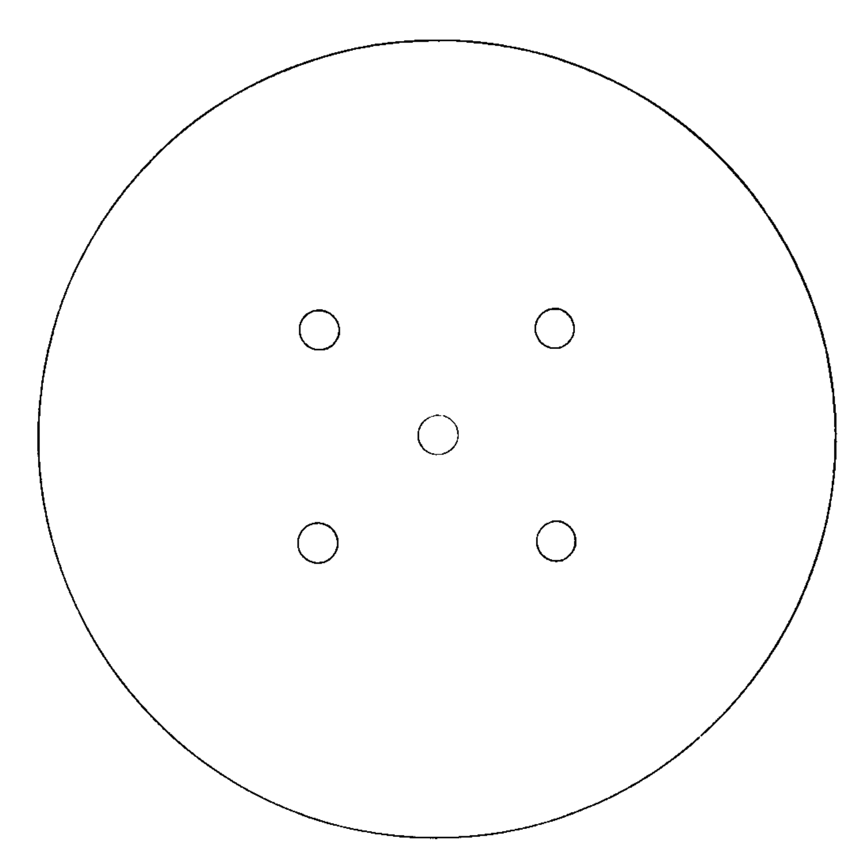
طريقة العمل PROCEDURE

١ ــ سيأخذ كل طالب ، طبق آجار أوكترلونى . أحفر عدد ٥ تجاويف بالطبق بثاقبة فلين مقاس ٢ متبعا النظام الموجود بشكل (٣) ، بوضع الطبق مباشرة على شكل (٣) واستخدام الشكل كدليل .

٢ ــ استعمل جهاز الشفط suction apparatus لسحب الآجار من التجاويف المحفورة .

٣ ــ املء التجويف المركزى بأنتيسيروم حصان مجهز فى أرنب rabbit-antihorse serum . املء كل تجويف من التجاويف الأربعة المحيطة بأنتجن مختلف من الأنتيجينات الأربعة المعطاه لك .

٤ ــ حضن الأطباق غير مقلوبة على درجة ٣٧° م . افحص الأطباق كل يوم لمدة ٧ أيام لتَكَون خطوط الترسيب .



شكل (٣) : قالب لعمل التجاويف فى أطباق أوكترلونى .

QUESTIONS اسئلة

١ ــ كيف تفسر وجود أكثر من خط ترسيب بين التجويف المركزى وأحد التجاويف الخارجية المحتوية على الأنتجن ؟

٢ ــ ماهى الهجرة الكهربائية المناعية Immunoelectrophoresis ؟

٣ ــ لماذا لا تنمو الميكروبات الملونة ، على طبق أوكترلونى أثناء التحضين ؟

٤ ــ أى الأنتيجينات تأتى من سيروم الحصان ؟

تدريب (٨٣)

اختبار تثبيت العامل المكمل Complement Fixation

المكمل Complement مركب بروتينى معقد يتأثر بالحرارة Thermolabile ، ويوجد فى دم حيوانات الدم الحار . وهو يلعب دورا جوهريا فى بعض التفاعلات المناعية ؛ ففى خلال تفاعلات الانتجن مع الجسم المضاد .. يثبت المكمل fixed أو يستهلك used up . لذلك .. فإن تفاعلات الأنتجن مع الجسم المضاد قد تختبر بقياس تثبيت المكمل .

ونظرا لأن ارتباط المكمل بمعقد الأنتجن والجسم المضاد Antigen - antibody complex لايمكن رؤيته – فإن نظاما من الدليل indicator system يجب أن يستعمل . ومن نظم الدليل الشائعة الاستعمال : كرات الدم الحمراء للأغنام ، وأجسام مضادة من نوع محللات الهيم Hemolysin (تنتج بحقن أرنب بكرات دم حمراء للأغنام) . فعندما يوجد المكمل حرا فى نظام محللات هيم خلايا الأغنام ، تسهل رؤية تحلل كرات الدم الحمراء للأغنام .

يستفاد من نظام الدليل هذا ، فى الطريقة المستخدمة لاختبار تثبيت المكمل ، لإثبات وجود أو غياب الأنتيجينات أو الأجسام المضادة المتخصصة . وفى طريقة الاختبار هذه .. فإن الأنتجن والسيروم ــ الذى قد يحتوى أو لايحتوى على الجسم المضاد المتخصص ــ يخلطان معا ، ويحضن الخليط مع كمية صغيرة من المكمل .

إذا كان الجسم المضاد المتخصص للأنتجن موجودا ، فإن الأنتجن يتفاعل مع الجسم المضاد ، ويثبت جزءا ــ أو كل ــ المكمل الموجود ، ثم باضافة النظام الدليل .. فإن خلايا الدم الحمراء لا تتحلل ، إلا إذا – وهذا طبيعى – أضيفت كميات أخرى من المكمل تزيد عن الكمية التى يمكن تثبيتها . ومع ذلك .. فإن الجسم المضاد المشتبه فيه ، إذا لم يكن موجودا ، فإن المكمل لا يثبت ، وتؤدى إضافة النظام الدليل إلى تحلل كرات الدم الحمراء .

يعتبر اختبار تثبيت العامل المكمل ، طريقة سيرولوجية أكثر حساسية عن الطرق التى أجريتها فى التدريبات السابقة ، وذلك للكشف عن وجود الأنتجن والجسم المضاد ، وتقدير تركيز كل منهما .

طريقة العمل PROCEDURE

لتسهيل إجراء هذا التدريب .. فإن مشرف العملى سيعد مسبقا التخفيفات المناسبة ، من محللات الهيم اللازمة للاتحاد مع معلق* ٢٪ كرات دم حمراء للأغنام ، كما سيعد أيضا مكمل خنازير غينيا (٢ وحدة) اللازم لتحليل نظام كرات الدم الحمراء مع محللات الهيم Hemolysin red-blood-cell system .

كما سيقوم مشرف العملى مسبقا بتسخين كل من الأنتجن (سيروم الحصان) ، والجسم المضاد (أنتيسيروم حصان مجهز فى أرنب) على درجة ٥٦° م لمدة ٣٠ دقيقة؛ لإيقاف نشاط inactivate المكمل الموجود بكليهما ، تجنبا من تداخله فى الاختبار .

ستأخذ سيروم الحصان بتخفيف ١٠$^{-٢}$ ، والأنتيسيروم بتخفيف مناسب ، وستقوم بعمل التخفيفات اللازمة فى محلول ملحى منظم حموضته بالباربيتال barbital-buffered saline لتزيد من حساسية الاختبار .

يحفظ المكمل المخفف فى ثلاجة لحين الاستعمال ، ولا تأخذه من الثلاجة إلا إذا كنت جاهزا لإضافته بالأنابيب .

١ ــ اعمل تخفيفات متسلسلة من سيروم الحصان الموقف نشاطه ، بملء ٦ أنابيب صغيرة بـ ٩ر٠ مل محلول ملحى منظم بالباريتال . ضف ١ر٠ مل سيروم حصان تخفيف ١٠$^{-٢}$ إلى الأنبوبة الأولى ، فيصبح التخفيف ١٠$^{-٣}$. أخلط جيدا ، ثم بالماصة أنقل ١ر٠ مل من تخفيف ١٠$^{-٣}$ إلى الأنبوبة الثانية لتحصل على تخفيف ١٠$^{-٤}$. استمر فى التخفيفات حتى تصل إلى التخفيف الأخير ١٠$^{-٨}$.

٢ ــ رقّم ١٠ أنابيب فارغة من ١ إلى ١٠ ــ وباتباع جدول (١) .. ضف ١ر٠ مل من كل تخفيف لسيروم الحصان الموقف نشاطه إلى الأنبوبة المناسبة . ومرة ثانية .. حسب جدول (١) .. ضف ٠,١ مل من الأنتيسيروم الموقف نشاطه ، inactivated rabbit-antihorse serum ثم ضف ١ر٠ من المكمل ، وفى النهاية المحلول الملحى ، وذلك لكل أنبوبة .

٣ ــ بسرعة .. حضن الأنابيب على درجة ٣٧° م فى حمام مائى لمدة ساعة .

٤ ــ فى أنبوبة .. اخلط ٥ر١ مل من معلق ٢٪ كرات دم الأغنام الحمراء بـ ٥ر١ مل من الهيموليسين . ضع الأنبوبة فى الثلاجة لحين الاستعمال .

(*) محلول ملحى فسيولوجى ٩ر٠٪ كلوريد صوديوم له pH ٧,٢ ــ (المترجمان) .

جدول (١) : النظام المتبع فى اختبار تثبيت المكمل .

رقم الأنبوبة	سيروم حصان موقف نشاطه (١ر٠ مل)	أنتيسيروم موقف نشاطه (مل)	مكمل (٢ وحدة) (مل)	محلول ملحى منظم بالباربيتال (مل)
١	١٠^-٣	١ر٠	١ر٠	—
٢	١٠^-٤	١ر٠	١ر٠	—
٣	١٠^-٥	١ر٠	١ر٠	—
٤	١٠^-٦	١ر٠	١ر٠	—
٥	١٠^-٧	١ر٠	١ر٠	—
٦	١٠^-٨	١ر٠	١ر٠	—
٧	١٠^-٣	—	١ر٠	١ر٠
٨	—	١ر٠	١ر٠	١ر٠
٩	—	—	١ر٠	١ر٠
١٠	—	—	—	١ر٠

٥ ــ بعد تحضين الأنابيب (الخطوة رقم ٣) لمدة ساعة فى الحمام المائى ، ضف لكل أنبوبة ٢ر٠ مل من نظام دليل كرات الدم الحمراء مع الهيموليسين الذى أعددته بالخطوة رقم ٤ .

حضن ثانية على درجة ٣٧° م لمدة ٣٠ دقيقة .

٦ ــ إفحص الأنابيب . الأنابيب من ٧ إلى ١٠ أنابيب مقارنة .

ــ تختبر الأنبوبة رقم ٧ للعوامل المضادة anticomplementary factors فى سيروم الحصان التى تعوق المكمل وتمنعه من تحليل كرات الدم الحمراء .

ــ تختبر الأنبوبة رقم ٨ لنفس العوامل الموجودة فى الأنتيسيروم .

ــ تبين الأنبوبة رقم ٩ أن كمية المكمل المستعملة كافية لتحليل كرات الدم الحمراء المتأثرة .

ــ تبين الأنبوبة رقم ١٠ أن كرات الدم الحمراء المتأثرة لا تتحلل بدون المكمل ، أو فى وجود المحلول الملحى .

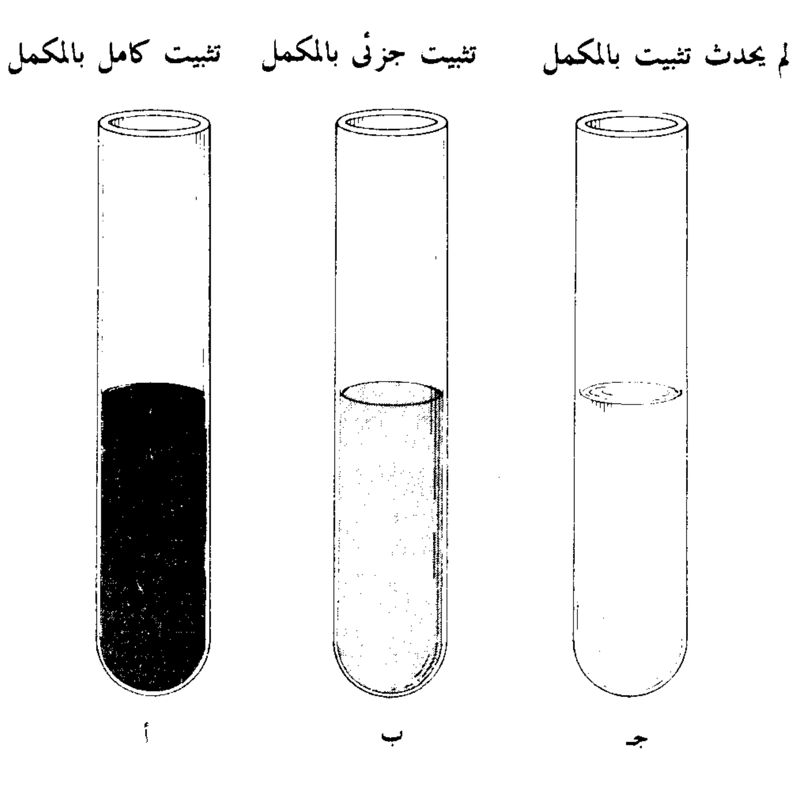
يجب أن تتحلَّل الأنابيب ٧، ٨، ٩ بالكامل إذا كانت الأنظمة تعمل بكفاءة .

افحص باق الأنابيب ، أى منها تحلل بالكامل أو جزئيا أو تلك التى لم يحدث بها تحلل .

عدم وجود تحلل لكرات الدم الحمراء يعنى حدوث تثبيت بالمكمل ، ويرمز لذلك فى التقرير بـ + + + + .

يعنى التحلل الكامل عدم حدوث تثبيت ؛ أى أن الاختبار سالب ، ويرمز لذلك فى التقرير بـ ـ أو صفر .

تسجل باقى الأنابيب نتائجها حسب كمية التحلل الذى حدث بها (انظر شكل ١) .



شكل (١) : درجات التثبيت بالمكمل .

(أ) لا يوجد تحلل لكرات الدم الحمراء .

(ب) تحلل لبعض كرات الدم الحمراء .

(جـ) تحلل لجميع كرات الدم الحمراء .

فى هذه التجربة .. يمكن تقدير تركيز الأنتجن Antigen titre ، ويعبر عنه بمقلوب التخفيف للأنبوبة التى تقع مباشرة قبل الأنبوبة التى حدث بها تحلل كامل .

اسئلة QUESTIONS

١ ــ اشرح كيف تعمل كل أنبوبة مقارنة للتأكد من اختبار تثبيت المكمل ؟

٢ ــ ما هى الأجسام المضادة من نوع محللات الهيم Hemolysin antibody ؟

٣ ــ يسمى اختبار تثبيت المكمل المستعمل عادة فى الكشف عن مرض الزهرى syphilis باسم اختبار .....

٤ ــ يوقف نشاط السيروم المستعمل فى اختبار تثبيت المكمل ، بتسخينه على درجة ٥٦° م لمدة ٣٠ دقيقة ، وذلك للتخلص من ...

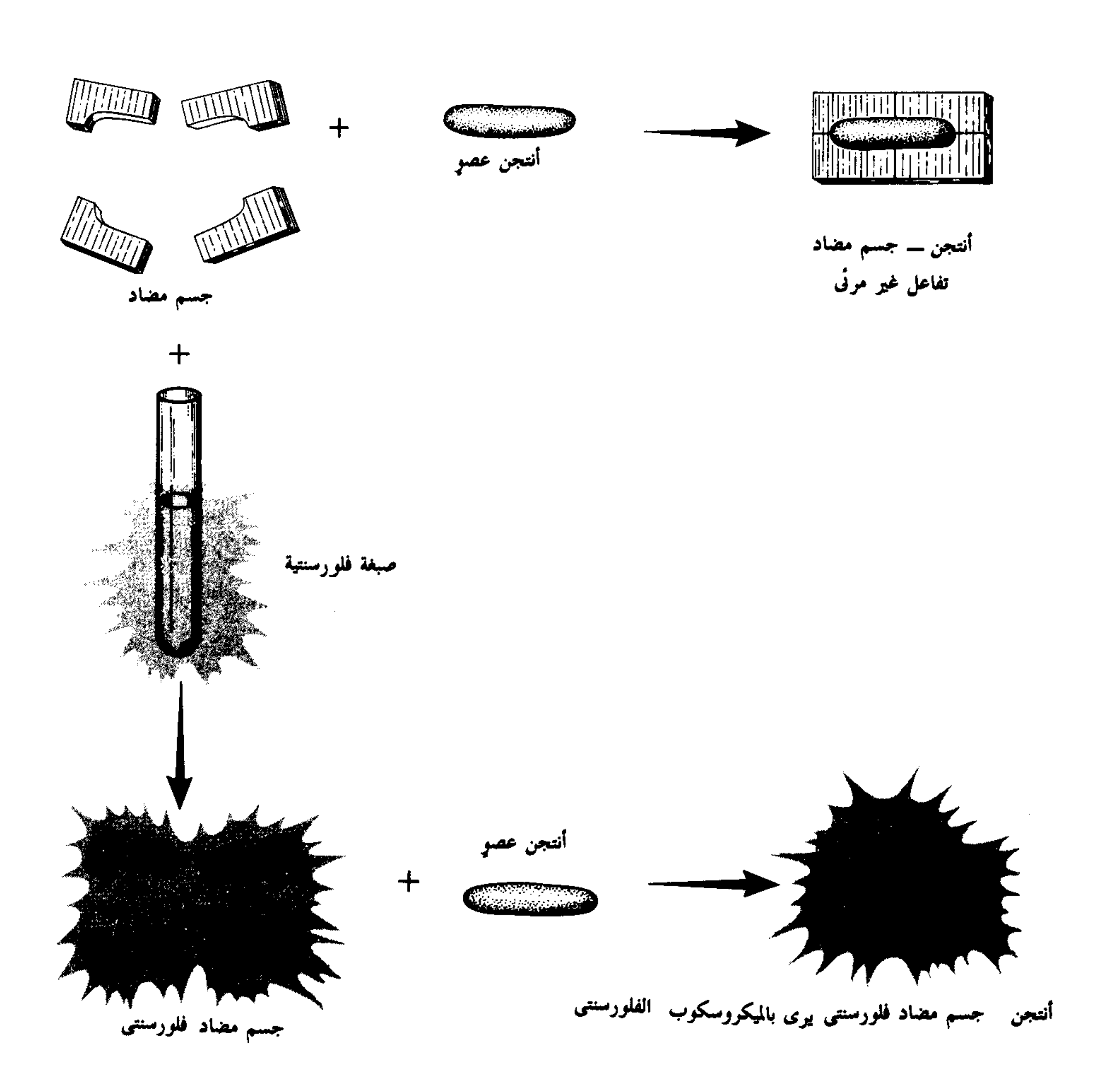
تدريب (٨٤)

طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية

Fluorescent — Antibody Technique (FA)

تتفاعل الصبغة الفلورسنتية Fluorescent dye مع البروتينات دون إحداث تغيرات جوهرية بخواصها البيولوجية . وعلى ذلك .. فإن أمثال هذه الصبغات يمكن استعمالها لترقيم Label أى جسم مضاد بروتينى دون تداخل مع نشاطه المناعى . فإذا كان الجسم المضاد متخصصا لمكونات السطح الأنتيجينية لنوع معين من البكتيريا ، فإن نتيجة تفاعل الجسم المضاد مع الأنتجن ، هو تغليف سطح الخلية الأنتجينية بالجسم المضاد . اذا عومل الجسم المضاد أولا بصبغة فلورسنتية .. ثم ارتبط انتجن الخلية والجسم المضاد ، فإن الخلية تتفلور Fluoresces عند إختبارها بالأشعة فوق البنفسجية . وباستعمال الميكروسكوب الفلورسنتى الذى يستخدم الأشعة فوق البنفسجية والزرقاء .. فإن البكتيريا المتفلورة يمكن رؤيتها بسهولة (انظر شكل ١) .

يمكن استعمال الأجسام المضادة الفلورسنتية Fluorescent antibodies المتخصصة لمسبب مرضى ، لتحديد إذا كان الميكروب المسبب للمرض موجودًا مع ميكروبات أخرى خليطة ، مثل تلك التى توجد فى البصاق وغسيل الحلق . فعلى سبيل المثال ، فإن بكتيريا *Streptococcus pyogenes* المسببة لالتهاب الزور المعدى Septic sore throat يمكن تمييزها ــ من بين الميكروبات الأخرى الخليطة ــ بصبغها بجسم مضاد متخصص فلورسنتى ، والفحص تحت الميكروسكوب الفلورسنتى .



شكل (١) : كيف يعمل الميكروسكوب الفلورسنتى على رؤية البكتيريا .

من الاستعمالات الأخرى لطريقة الاجسام المضادة الفلورسنتية (FA) بالنسبة للمزارع الخليطة ، هو تعريف الميكروب المسبب للمرض للإنسان ، السالمونيلا ، الذى يوجد فى الماء وبعض الأغذية ، مثل اللحوم ومنتجات الدواجن . فى هذا الاختبار (FA) .. يستعمل تحضير تجارى من الأجسام المضادة الفلورسنتية — يسمى أجسامًا مضادة متعددة الاتحاد polyvalent conjugates — تتفاعل مع مجموعة كبيرة من مزارع السالمونيلا *Salmonella* species ، ولكنها لا تتفاعل مع أنواع بكتيرية أخرى . ولقد أصبحت طريقة FA طريقة قياسية للكشف عن السالمونيلا .

لزيادة أعداد خلايا السالمونيلا حتى يصبح الكشف عنها أكثر سهولة .. فإن عينات الغذاء ، أو العينات الأخرى المطلوب فحصها ، تنمى فى بيئة إكثار غير انتقائية Non- selective enrichment medium لتشجيع الكبتيريا الموجودة على النمو . ينقل النمو بعد ذلك إلى بيئة إكثار انتقائية selective enrichment medium للسالمونيلا مثل بيئة بويون السلينيت والسيستين selenite-cystine broth . بعد التحضين (٢٤ ساعة) ، ومباشرة قبل إعداد الشرائح للفحص الميكروسكوبى .. تنقل كمية صغيرة من النمو من مزرعة الإكثار الانتقائية ، إلى بيئة إكثار انتقائية تالية (بيئة الإكثار الانتقائية الثانية) post- selective enrichment medium مثل بيئة مرق التربتيكاز والصويا والتربتوز Trypticase- soy- tryptose broth ، والتحضين على درجة ٣٧° م فى حمام مائى لمدة ساعتين .

فى التدريب التالى .. قام مشرف العملى بإجراء خطوات التجربة بدءا من أخذ العينة الأصلية حتى بيئة الإكثار الانتقائية الثانية ، وستستعمل هذه المزرعة فى صبغ الأجسام المضادة الفلورسنتية .

طريقة العمل PROCEDURE

١ — انقل غمسة إبرة من كل مزرعة من مزارع بيئة الإكثار الانتقائية الثانية إلى التجاويف التى بالشريحة المغلفة coated slides ، واتركها لتجف هوائيا .

٢ — ثبت الأغشية فى محلول إيثانول — كلوروفورم — فورمالين (٦٠ : ٣٠ : ١٠) لمدة ٣ دقائق .

٣ — اغسل الأغشية بكحول ٩٥٪ ثلاث مرات وجفف هوائيا .

٤ — غط الأغشية المجففة بمحلول الأجسام المضادة المتعددة الاتحاد للسالمونيلا *Salmonella* polyvalent conjugates (عادة نقطة واحدة لكل غشاء) .

٥ — ضع الغشاء فى جو رطب لمدة ٣٠ دقيقة (يصلح لهذا الغرض طبق بترى مغطى يحتوى على ورق ترشيح مبلل) .

٦ — تخلص من الأنتيسيروم الزائد ، ثم اغسل الشريحة بحرص بمحلول ملحى به منظم فوسفاتى Phosphate- buffered saline (PBS) مضبوط عند pH ٧٫٥ .

٧ — انقع الشريحة فى محلول حديث التحضير من PBS لمدة ١٠ دقائق ، اغسل بالماء وجفف هوائيا .

٨ ــ ضف للغشاء نقطة محلول ملحى به جليسرول glycerol- saline مضبوط عند pH ٥ر٧ . غط بغطاء الشريحة مع مراعاة التخلص من فقاقيع الهواء المحبوسة .

٩ ــ أفحص الأغشية بالميكروسكوب الفلورسنتى ، وذلك بعد أن تكون قد فحصت الأغشية جيدا بالقوة الصغرى للتأكد من انتظام توزيع صبغة الفلورسين ثم فحصت بالعدسة الزيتية لتحديد الخلايا الفردية التى ستفحصها بالميكروسكوب الفلورسنتى .

الخلايا الواضحة الرؤية ، العصوية القصيرة التى تعطى وميضا فلورسنتيا أخضر مصفرًا ، تعتبر ٤+ على تدريج يبدأ من ١ + للخلايا الصعبة التحديد ، المعتمة فلورسنتيا . لا تعطى الخلايا السالبة وميضا فلورسنتيا .

تتطلب طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية ، خبرة فى تفسير القراءات الفلورسنتية ، كما تتطلب وجود العديد من شرائح المقارنة للوصول إلى نتائج قاطعة .

أسـئلة QUESTIONS

١ - أى المزارع المختبرة تلك التى كانت مرئية بالميكروسكوب الفلورسنتى ؟

٢ - كيف تفسر وجود كميات صغيرة ذات خلفية فلورسنتية فى المزارع المفروض أنها لا تحتوى على سالمونيلا ؟

٣ - ما هو الغرض من نقع الشرائح فى الخطوة رقم ٧ ؟

٤ - فى أى الأغراض الأخرى - بالاضافة إلى تعريف الميكروبات المرضية - يمكن استعمال طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية ؟

تدريب (٨٥)

الاختبار السيرولوجى لمرض المونونيوكليوزس المعدى

Serological Test for Infectious Mononucleosis

مرض المونونيوكليوزس المعدى infectious mononucleosis ، مرض حاد يصيب صغار الشباب ، ويؤثر على الأعضاء الليمفاوية Lymphoid organs . ويرتبط المرض بالفيروس المسمى إبستين ــ بار Epstein- Barr virus . هذا الفيروس أحد أفراد مجموعة فيروسات الهربس Herps virus group ، ويتميز بوجود حمض DNA ذى خيط مزدوج مجدول Double- stranded داخل كابسيد (الغطاء البروتينى للفيروس) ذات أوجه عديدة من عشرين وجها Icosahedral capsid ، ويحيط بالكابسيد غلاف

يكتسبه الفيروس من الغشاء النووى لخلية العائل . وتمتاز فيروسات الهربس عموما بكفاءتها العالية فى العدوى .

يعتبر الفحص السيرولوجى لدم المريض ضروريا ، وذلك لتمييز الأعراض الإكلينيكية لمرض المونونيوكليوزس المعدى عن أعراض الأمراض الأخرى المعدية ، مثل : الانفلونزا Influenza ، الحصبة الالمانية Rubella والالتهاب الكبدى الوبائى Hepatitis .

يعتمد الأختبار السيرولوجى لمرض المونونيو كليوزس ، على قياس أجسام مضادة معينة ذات صفات خاصة تظهر فى دم المريض أثناء المرض . ويعتمد هذا الاختبار على تجمع كرات الدم الحمراء للحصان بالأجسام المضادة الهيتروفيلية* Heterophile antibodies لمرض المونونيوكليوزس . ونظرا لأن سيروم المريض يحتوى على أجسام هيتروفيلية أخرى تتجمع أيضا بواسطة كرات الدم الحمراء للحصان ، فإن الامتصاص التفريقى differential absorption يعتبر ضروريا لإزالة هذه الأجسام ، حتى يمكن تمييز الأجسام المضادة المتخصصة لمرض المونونيوكليوزس .. فقبل إجراء اختبار تجميع كرات دم الحصان الحمراء بواسطة سيروم المريض ، فإن سيروم المريض يُمتص بخلايا كلية خنزير غينيا guinea- pig ، لإزالة ما به من أجسام مضادة هيتروفيلية عدا تلك الخاصة بالمونونيوكليوزس . وعلى ذلك .. فإن امتصاص الأجسام المضادة الهيتروفيلية بكرات دم الحصان الحمراء ، وليس بخلايا كلية خنازير غينيا ، يكمل عملية التعرف على الأجسام المضادة الهيتروفيلية للمونونيوكليوزس الموجودة فى سيروم المريض .

طريقة العمل PROCEDURE

١ — أمامك عينة دم انسان لفحصها للأجسام المضادة الخاصة بمرض المونونيوكليوزس المعدى .

٢ — ضع شريحة الاختبار (مرسوم عليها مربعين مرقمين ١، ٢) على سطح مستوى تحت مصدر ضوء مباشر .

٣ — ضع ماصة شعرية دقيقة microcapillary pipette (الطرف الذى عليه علامة بالخط الأسود) فى رقبة الانتفاخ المطاطى Rubber bulb .

٤ — قلب كرات دم الحصان الحمراء عدة مرات لخلط الخلايا . ضع الماصة الشعرية الدقيقة فى

(*) الأجسام المضادة الهيتروفيلية هى جلوبيولينات مناعية immunoglobulins ، لها القدرة على التفاعل مع الأنتيجينات غير المرتبطة بشكل واضح بتلك التى تشجع على تكوينها . وعلى ذلك .. فبينما نجد أن الأجسام المضادة الهيتروفيلية لمرض المونونيوكلوزس يشجع على تكوينها العدوى بفيروس Epstein-Barr ، فإن هذه الأجسام المضادة الهيتروفيلية تجمع كرات دم الحصان الحمراء .

الخلايا ، سامحًا للماصة بأن تمتلئ حتى العلامة (٢٠ لامبدا Lambda) . حاذر من سحب الخلايا بداخل الانتفاخ المطاطى .

٥ ـــ ضع ١٠ لامبدا من خلايا كرات دم الحصان الحمراء فى طرف كل من المربعين ٢،١ على الشريحة . لكى تضع هذه الكمية من الخلايا على طرف المربع ، ضع إصبع السبابة على الثقب بأعلى الانتفاخ المطاطى ، واضغط برفق حتى يصل مستوى الخلايا بالماصة إلى العلامة الأولى . المس طرف الماصة بطرف المربع رقم ١ حتى تنزل الخلايا . ضع كمية الـ ١٠ لامبدا من الخلايا المتبقية بالماصة ، بركن المربع رقم ٢ .

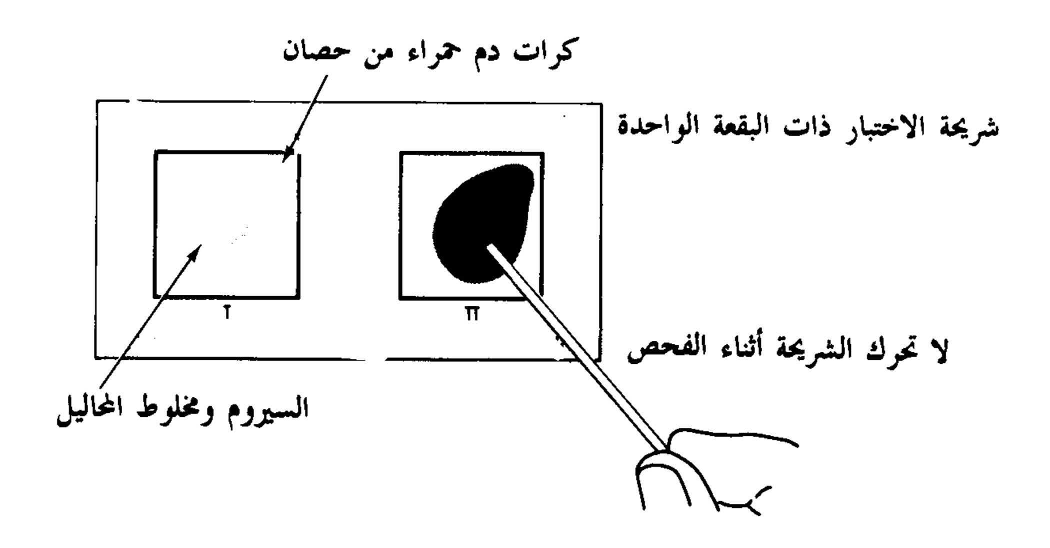
٦ ـــ باستعمال ماصة باستير .. ضع نقطة ممزوجة جيدا من خلايا كلية خنزير غينيا فى وسط المربع رقم ١ .

٧ ـــ ضع نقطة ممزوجة جيدا من محلول كرات دم حمراء البقر beef erythrocyte reagent فى وسط المربع رقم ٢ .

٨ ـــ ضف نقطة من سيروم الاختبار test serum لوسط كل مربع على الشريحة .

٩ ـــ مع تجنب كرات دم الحصان الحمراء الموجودة فى ركن المربع على الشريحة ، اخلط بعصى خشبيه نظيفة سيروم الاختبار مع المحاليل الموجودة فى وسط كل من مربعى ١، ٢، ثم بقليل من الحركات الدائرية (١٠ أو أقل) امزج خلايا كرات دم الحصان الحمراء مع الخليط الموجود بوسط المربع ، ثم انشر الخليط على كل سطح المربع (انظر شكل ١) .

حاذر من تحريك الشريحة أو رفعها بعد الخلط أثناء فترة تفاعل الخلايا .



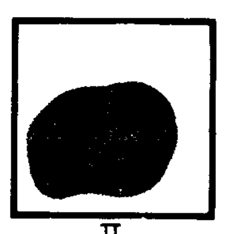
شكل (١) : تحريك مخلوط الاختبار حركات دائرية على سطح مربع رقم ٢

١٠ ــ افحص لتجمع الخلايا بعد دقيقة واحدة من الخلط .

يدل وجود تكتل أقوى من الخلايا فى مربع ١ بالمقارنة بمربع ٢ ، على أن الاختبار موجب لمرض المونونيوكليوزس المعدى (انظر شكل ٢) .

تحذير : تداول كل عينات السيروم كما لو كانت قادرة على نقل مرض الالتهاب الكبدى الوبائى .





I II

لا تحرك الشريحة أثناء الفحص

شكل (٢) : مظهر الاختبار الموجب لمرض المونونيوكليوزس .

اسئلة QUESTIONS

١ ــ ما هى الأجسام المضادة الهيتروفيلية Heterophile antibodies ؟

٢ ــ لماذا يجب عمل امتصاص تفريقى للسيروم حتى نتمكن من إجراء الاختبار السيرولوجى لمرض المونونيوكليوزس ؟

٣ ــ بأى ظروف باثولوجية أخرى يرتبط فيروس إبستين ــ بار Epstein- Barr virus ؟

٤ ــ كم تساوى اللامبدا من الملليلتر ؟

تدريب (٨٦)

التعرف على الكيميائيات المسرطنة : اختبار أيمز

Detection of Chemical Carcinogens: Ames Test

يعتقد أن أغلب سرطانات الإنسان تسببها عوامل كيميائية فى الوسّط البيئى المحيط ؛ لذلك فإن الوسيلة الفعالة لتقليل حدوث الإصابة بالسرطان ، هى التعرف على تلك الكيميائيات المسماة

المسرطنات Carcinogens ، والعمل على تقليل وجودها بالوسط البيئى . ولقد وجدت أن نسبة كبيرة من الكيميائيات المسرطنة Chemical carcinogens ، تسبب حدوث طفرات ، أى أنها مطفرة mutagens . واحدة من النظريات التى تجد قبولا plausible theory لتفسير عمل المسرطنات ، هو أن هذه المواد تسبب تلفا damage وطفورا mutation بالحمض النووى DNA فى الثدييات . هذا الاحتمال يسهل لنا التعرف على المسرطنات ، كمطفرات ، باستعمال نظم اختبار بكتيرية Bacterial test systems . وهذه الطريقة سريعة ، وحساسة ، وأقل تكلفة للتعرف على المسرطنات ، إذا ما قورنت باستخدام حيوانات التجارب التى تأخذ وقتا طويلا وتكلف كثيرا .

من الاختبارات الميكروبية التى يعتمد عليها كثيرا فى التعرف على المسرطنات ، اختبار ميكروسوم الثدييات بالسالمونيلا *Salmonella* / mammalian- microsome test (اختبار أيمز) ، الذى قام به Dr. Bruce Ames وزملاؤه . وفى اختبار ايمز هذا الخاص بالكشف عن الخلايا المطفرة ، وبالتالى عن احتمال وجود عوامل مسرطنة ، يستعمل سلالة خاصة من بكتيريا التيفود* *Salmonella typhimurium* ، لاتنمو إلا إذا أضيف للبيئة هيستيدين Histidine - dependent strain . وهذه الخلايا البكتيرية ذات العوز الغذائى للهستيدين Histidine- requiring cells ، عندما تلقح فى بيئة بها اثار من الهيستيدين ، فإن خلايا قليلة منها ترتد إلى حالتها الأولى فى التغذية ، فلا يتوقف نموها على وجود الهيستيدين بالبيئة Histidine- independent ، وبذلك فإنها تستطيع أن تنمو وتكون مستعمرات فى غياب الهيستيدين . فإذا أضيفت مادة كيميائية مطفرة chemical mutagen إلى البيئة الخالية من الهيستيدين .. فإن معدل التحول العكسى reversion rate من خلايا تعتمد على الهيستيدين إلى خلايا لا تعتمد على الهيستيدين يزيد كثيرا . وعلى الرغم من أن آثار الهيستيدين المضافة غير كافية لتكوين مستعمرات من الخلايا ، إلا أن تلك الآثار الموجودة فى بيئة الاختبار test medium ، تسمح للخلايا بانقسامات خلوية محدودة ، وهذا يعتبر فى بعض الحالات ضروريا لتكوين طفرات .

لا يسبب كثير من الكيميائيات المسرطنة سرطانات أو يحدث طفرات مالم تمثل metabolized إلى مواد نشطة . وبالنسبة للإنسان والحيوان .. فإن هذا التحول التمثيلى لتلك المواد إلى مسرطنات نشطة يتم أساسا فى الكبد . لذلك .. فإنه بتشجيع عملية تحول الكيميائيات المسرطنة أو المطفرة ، من الحالة غير النشطة إلى الحالة النشطة ، فإن تلك المواد قبل إضافتها إلى البيئة المزرعية ، تعامل – فى اختبار أيمز – بمجنس كبد الفأر rat-liver homogenate .

(*) السلالات الطافرة التى حصل عليها Dr. Ames ذات عوز غذائى للهستيدين بسبب تلف أوبيرون الهيستيدين deletion in histidine operon ولذلك فإنها طفرات غير مرتدة عادة . وأيضا .. فإن هذه السلالات لا تملك النظام الخاص بإصلاح عيوب حمض DNA ، وعلى ذلك فإن العيوب التى تحدث فى DNA لا تصحح ، مما يزيد من حساسية تلك السلالات لتأثير المواد المطفرة . بالإضافة إلى ما سبق .. فإن تلك السلالات الطافرة حدث بها خلل (عيوب) بطبقة الليبيدات العديدة السكريات lip poly – saccaride layer المكونة لسطح خلاياها ، مما يسمح بسهولة دخول المطفرات إلى داخل الخلية .

بعض السلالات التى استعملت فى هذا الاختبار ، تحمل أيضا بلازميدات من نوع R - plasmids تزيد من حساسية هذه السلالات لتأثير المطفرات الضعيفة .

يتم تحول الكيميائيات المسرطنة المستعملة فى هذا الاختبار ، وهى من مركبات النيترو nitrocarrinogens ، إلى الصورة النشطة ، بواسطة إنزيمات النيتروريداكتيز nitroreductases الموجودة بنفس خلايا البكتيريا المستعملة بالاختبار ؛ مما يغنى فى هذا التدريب عن استعمال مجنس كبد الفأر .

طريقة العمل PROCEDURE

١ ـــ جهز أنبوبتين آجار طرى soft agar سايح ، وطبقين آجار بيئة الكفاف . تحت شروط التعقيم .. ضف لكل أنبوبة آجار طرى ٢ر٠ مل محلول البيوتين والهيستيدين المعقم sterile biotin-histidine solution . احفظ الأنابيب على درجة ٤٥° م فى حمام مائى .

٢ ـــ تحت شروط التعقيم .. ضف ٣ نقط من مزرعة *Salmonella typhimurium* strain 1538 لكل أنبوبة آجار طرى .

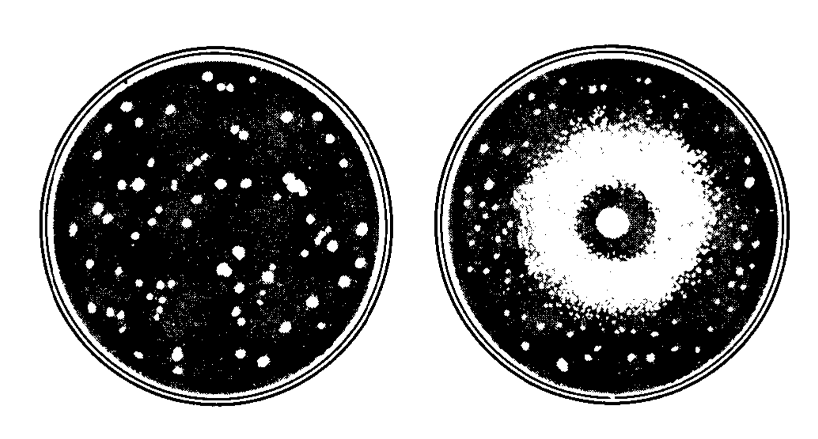
٣ ـــ اخلط محتويات الأنبوبة جيدا ، وبسرعة صب الآجار الطرى فوق سطح طبق آجار بيئة الكفاف . أمل الطبق برقة لنشر الآجار الملقح بالخلايا مستويا على سطح طبق الآجار .

٤ ـــ ضع ثلاثة أقراص معقمة على سطح آجار أحد الأطباق ، رقم قاع الطبق تحت كل قرص بعلامة لتميز المادة الكيميائية المختبرة . بلل كل قرص بالمادة الكيميائية المخصصة له .

تحذير : الكيميائيات المعطاة لك لاختبارها ، مفترض أنها مواد مسرطنة ، لذلك يراعى الحذر الشديد أثناء تداول هذه المواد .

٥ ـــ حضن أطباق الآجار على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٦ ـــ لاحظ أطباق الآجار لمستعمرات كبيرة مركزة حول الأقراص . تبين وجود طفرات رجعية مرتدة Back mutation revertants .



شكل (١) : اختبار البقعة للكشف عن المطفر . على اليسار : طبق المقارنة ـــ يبين خلايا مرتدة ذاتيا (من تلقاء نفسها)

على اليمين : طبق يبين عددًا كبيرًا من الخلايا المرتدة نتجت من تأثير العامل المطفر الموجود بوسط الطبق .

٧ — سجل عدد المستعمرات الكبيرة التى حول كل قرص ، وكذلك التى على طبق آجار بيئة الكفاف الذى لم تضف اليه أى كيميائيات للاختبار .

٨ — سيقوم مشرف العملى بإعداد أطباق المقارنة المحتوية على بيئة الآجار المغذى . افحص هذه الأطباق . هل توجد فروق فى النمو بين المستعمرات النامية على أطباق آجار بيئة الكفاف التى لم تضاف إليها كيميائيات ؟

هل أحدث أى من الكيميائيات المختبرة تثبيطا للنمو على أطباق الآجار المغذى ؟

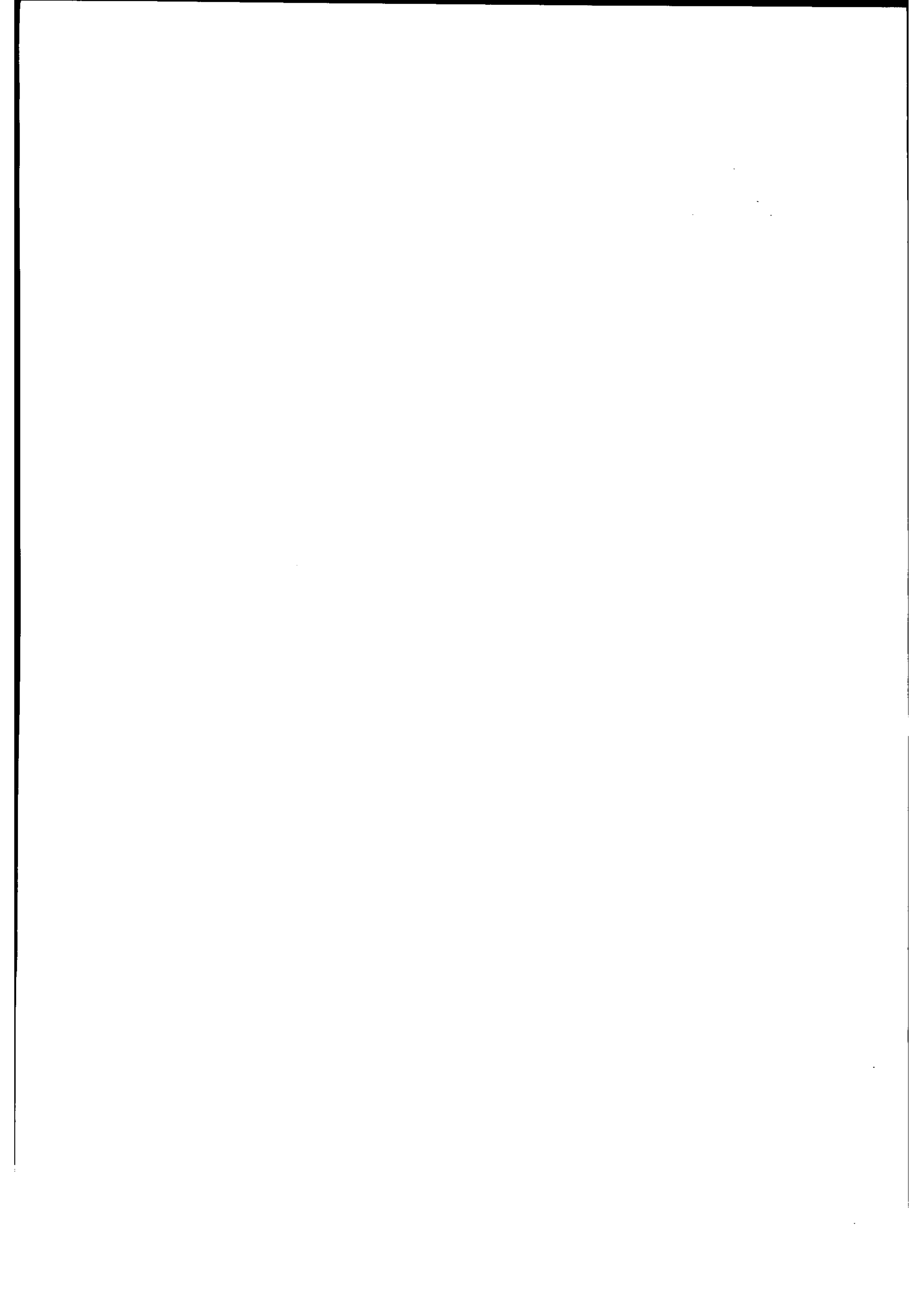
اسئلة QUESTIONS

١ — لماذا يجب أن يحتوى الآجار الطرى على هيستيدين ؟

٢ — لماذا يستعمل بشكل اعتيادى مجنس كبد الثدييات mammalian - liver homogenate فى اختبار أيمز ؟ ولماذا لم يستعمل هذا المجنس فى الاختبار الحالى ؟

٣ — فى هذا التدريب .. أى أطباق الآجار يستخدم للمقارنة ؟ اشرح ؟

٤ — من الفحص الدقيق للأطباق .. سيظهر وجود خلفية من النمو المتشابك المعتم قليلا من السهل تمييزه عن المستعمرات الكبيرة المرتدة — ما هو تعليلك لهذا النمو ؟



ملحق

Appendix

الصبغات والمحاليل

Stains and Reagents

الصبغـــات

أخضر مالاكيت (تدريبا ١٢ ، ٦٥)

Malachite green

٥٪ محلول مائى من أكسالات أخضر المالاكيت .

أزرق الميثلين (تدريبا ٨ ، ١١)

Methylene blue stain

١,٤٨ جم / ١٠٠ مل محلول كحولى مشبع من أزرق الميثلين ، ٦٠٠ مل KOH ٠,٠١٪ ، ٢٠٠٠ مل ماء مقطر . اخلط ثم رشح .

أزرق الميثلين لصبغة العد المباشر بالميكرسكوب (تدريب ٧١)

Methylene blue solution for direct microscopic stain (Levowitz-Weber modification of Newman-Lampert stain).

ضف ببطء ٠,٦ جم كلوريد أزرق المثيلين النقى إلى ٥٢ مل كحول إيثانول ٩٥٪ و ٤٤ مل نتراكلورو إيثان (تجارى) فى زجاجة سعة ٢٠٠ مل .

رج لإذابة المكونات ، ثم اترك فى الثلاجه على درجة حوالى ٥° م لمدة ١٢ - ٢٤ ساعة . ضف ٤ مل حمض خليك ثلجى ورشح فى ورق ترشيح واتمان رقم ٤٢ . خزن المحلول فى وعاء نظيف محكم القفل بسدادة بلاستيك . يلاحظ أن وجود آثار من الماء قد يسبب متاعب مع هذه الصبغة .

سودان بلاك ب

Sudan Black B

٠,٢ جم سودان بلاك ب فى ١٠٠ مل كحول إيثانول ٧٠٪ .

رايت (صبغة جيمسا) (تدريب ٧٩) **Wright's (Giemsa) stain**

٣ جم صبغة رايت ، ٥ جم صبغة جيمسا ، ٣٠ مل جليسرين . سخن إلى درجة ٦٠°م لمدة ٣ ساعة فى ٩٧٠ مل كحول ميثايل انهيدروس anhydrous methyl alcohol (خال من الأسيتون) . رشح .

صفرانين **Safranin**

١٠٠ مل صفرانين Safranin O (محلول كحولى مشبع ٢,٥ جم / ١٠٠ مل) فى لتر ماء مقطر .

كاربول الفوكسين (تدريبا ٨ ، ١١) **Carbol fuchsin**

٣٠٠ مل فوكسين قاعدى (محلول كحولى مشبع) ، ١٩٠٠ مل فينول (٥٪ محلول مائى) .

كحول حامضى (تدريب ١١) **Acid alcohol**

٩٥٪ كحول إيثانول يحتوى ٢,٥٪ HNO_3 .

كريستال بنفسجى (تدريبا ٨ ، ١٠) **Crystal violet**

واحد حجم من الكريستال البنفسجى (محلول كحولى مشبع ، ٢٠ جم / ١٠٠ مل إيثانول) فى أربعة أحجام من ١٪ محلول مائى أكسالات الأمونيوم . اترك أكسالات الأمونيوم لمدة ليلة ، أو سخن بلطف ، للإذابة ، ثم اخلط بمحلول الكريستال البنفسجى ورشح .

ماى ــ جرونوالد **May - Grunwald stain**

يمكن الحصول على هذه الصبغة من National Aniline Company, 40 Rector street, New York, N.Y.

نجروسين (تدريب ٩) **Nigrosin**

١٪ محلول مائى .

يود صبغة جرام **Gram's iodine**

١,٠ جم بللورات يود ، ٢,٠ جم أيوديد بوتاسيوم ، ٣٠٠ مل ماء مقطر ، ٣,٠ جم بيكروبونات الصوديوم .

يود وكحول قاتل للميكروبات **Iodine-alcohol disinfectant**

استعمل يود صبغة جرام .

المحاليل Soultions

أحمر الميثايل ، انظر دلائل **Methyl red**

إستربتوميسين (تدريب ٥٣) **Streptomycin**

حضر كمية كافية من المحلول بتركيز ١٠ ميكروجرام/ مل من الإستربتوميسين فى ماء مقطر معقم . عند الاستعمال يضاف من هذا المحلول ٠,٤٥ مل للآجار ، ٠,٠١ مل و ٠,٥ مل للمرق .

ألفانافثول (تدريب ٤٤) **α - Naphthol**

٠,٥٪ الفانافثول فى ٩٥٪ كحول ايثانول .

ألفانافثايل أمين (تدريب ٧٤) انظر دليل النترات ب **α-Naphthylamine**

إنزيم ليسوزيم **Lysozyme**

لكل ١٠٠ مل : ٠,٢ جم لسيوزيم . عقم بالترشيح وهو محفوظ فى الثلج .

إنزيم محلل للـ د . ن . أ **DN ase**

لكل ١٠٠ مل : ٠,٢ جم DNase – عقم بالترشيح .

أيدروكسيد بوتاسيوم مع كرياتين (تدريب ٤٤) **Potassium hydroxide creatine**

٤٠ جم KOH + ٠,٣ جم كرياتين فى ١٠٠ مل ماء . احفظ المحلول فى الثلاجة ، على أن يستعمل خلال أسبوع .

بارا أمينو داى ميثايل أنيلين (دليل أنزيم الأوكسيداز) (تدريبا ٤٠ ، ٤٨)
P- amino dimethyl aniline

أذب ١ جم p-amino dimethyl aniline oxalate فى ١٠٠ مل ماء مقطر ، باستعمال التسخين الخفيف . بَرِّدْ ثم احفظ فى زجاجة بنية اللون .

بارا نيترو فينايل فوسفات **p-nitro phenyl phosphate**

٢٪ محلول مائى من بارا نيترو فينايل فوسفات .

(محلول) تخفيف / انظر ماء مقطر منظم الحموضة **Diluent**

ترومسدورف (محلول) (تدريب ٧٤) **Trummsdorf**

١ – ضف ببطء ، مع التقليب المستمر ، ١٠٠ مل ٢٠٪ محلول مائى $Zn\ Cl_2$ يَغلى ، إلى خليط من ٠,٠، جم نشا ، فى ١٥٠ مل ماء .
استمر فى التسخين ، حتى يذوب النشا بقدر الإمكان ، ويصبح المحلول رائقًا تقريبًا .

٢ – خفف بالماءِ وضفْ ٢ جم من أيوديد الزنك ، أو أيوديد البوتاسيوم .

٣ – خفف إلى لتر ، رشح واحفظ فى زجاجة ، مغطاة جيدًا بسدادة من الكاوتش ، فى مكان مظلم .

ثيوكبرتيات الصوديوم **Sodium thiosulfate**

٠,٠٢٥ ع .

جلوكوز الكفاف **Minimal glucose**

(أ) ١ مل من محلول جلوكوز ٥٠٪ .

(ب) ٠,٢ جم $(NH_4)_2\ SO_4$ ، ١,٤ جم $K_2H\ PO_4$ ، ٠,٦ جم $KH_2\ PO_4$ ، ٠,١ جم سترات صوديوم ، ٠,٠٢ جم $Mg\ SO_4.\ 7H_{20}$ ، ١٠٠ مل ماء مقطر .
عقم أ ، ب ، برد ثم اخلط أ ، ب معا تحت شروط التعقيم .

داى فينايل أمين (تدريب ٧٤) **Diphenylamine**

٠,٧ جم داى فينايل أمين ، ٦٠,– مل حامض كبريتيك مركز ، ٢٨,٨ مل ماء ، ١١,٣ مل حامض أيدروكلوريك مركز .

أذب الداى فينايل أمين فى حمض الكبريتيك ، ثم ضف الماء . برد الخليط ببطء ، ضف حامض الأيدروكلوريك ، ثم اترك الخليط لمدة ليلة .

دليل النترات (تدريب ٧٤) **Nitrate reagent**

(أ) ٠,٨٪ حمض سلفانيليك . أذب ٨ جم من الحمض فى ١٠٠٠ مل ٥ ع حامض خليك . احفظ فى زجاجة مغطاة بسدادة من الكاوتش .

(ب) ٠,٥٪ ألفانافثايل أمين . أذب ٥ جم من الدليل فى كمية أقل من ١٠٠٠ مل ٥ ع حامض خليك ٣٠٪ ، وذلك بالتسخين الهين . رشح خلال قطن ماص مغسول . خزن فى زجاجة بنية اللون ، مغطاة بسدادة من الكاوتشوك . برِّدْ .

دليل النشا **Starch indicator**

٥ جم نشا / لتر .

دليل حمض السلفانيليك / انظر دليل النترات أ **Sulfanilic acid reagent**

دليل كوفاكس **Kovacs reagent**

لكل لتر : ٥٠,– جم p-dimethyl aminobenzaldehyde ، ٧٥٠,– مل كحول أمايل أو بيوتايل ، ٢٥٠,– مل حمض أيدروكلوريك مركز .

زيت غمس العدسة الزيتية **Immersion oil**

زيت كارجيل cargille – خليط بنسبة ١ : ١ حجما من النوع أ قليل اللزوجة والنوع ب عالى اللزوجة .

فاسبار **Vaspar**

١ كجم فازلين ، ١ كجم بارافين . اذب ، واخلط ، وصب فى أنابيب باستعمال قمع .

فوسفات $\frac{١}{٥}$ مولر رقمه الأيدروجينى ٥,– **Phosphate M/5, $p^{H}5$**

٢٧,٢ جم KH_2PO_4 باللتر تعطى محلولاً ، رقمه الأيدروجينى ٥,– تقريبًا .

فينولفثالين / انظر دلائل **Phenolphthalein**

كبريتات منجنيز (دليل) **Mn So_4 reagent**

٤٨٠,٠ جم $MnSO_4$-$4H_{20}$ باللتر .

كلوريد حديديك (تدريب ٣٧) Ferric chloride

١٠,٠ جم كلوريد حديديك فى ١٠٠ مل ماء . احفظ فى الثلاجة .

ماء مقطر منظم الحموضة Buffered distilled water

أذب ٣٤,٠ جم KH_2PO_4 فى ٥٠٠ مل ماء . ضف حوالى ١٧٥,٠ مل ١ ع Na OH ، وخفف إلى لتر بالماء المقطر . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٧,٢ . عند الاستعمال .. خفف ١ مل إلى ٨٠٠ مل .

محاليل ماكفرلاند القياسية لجهاز Nephelometer

Mc Farland nephelometer standards

جدول (أ - ١) : محاليل ماكفرلاند القياسية للجهاز .

	رقم الأنبوبة (تستعمل أنابيب مسدودة)									
	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠
١٪ كلوريد باريوم / مل	٠,١	٠,٢	٠,٣	٠,٤	٠,٥	٠,٦	٠,٧	٠,٨	٠,٩	١,٠
١٪ حمض كبريتيك / مل	٩,٩	٩,٨	٩,٧	٩,٦	٩,٥	٩,٤	٩,٣	٩,٢	٩,١	٩,٠
كثافة الخلايا تقريبًا (× $١٠^{٨}$/ مل)	٣	٦	٩	١٢	١٥	١٨	٢١	٢٤	٢٧	٣٠

محلول ملحى Saline

٩,- جم كلوريد صوديوم فى اللتر .

محلول ملحى به جليسرول (تدريب ٨٤) Glycerol saline solution

اخلط ٩ مل جليسرول مع ١ مل محلول منظم به كربونات (٤,٤ مل Na_2CO_3 ٠,٥ مولر فى ١٠٠ مل $NaHCO_3$ ٠,٥ مولر) . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٩,- .

محلول ملحى مع بورات (تدريب ٨٢) Borate saline

١٠٠ مل محلول منظم بالبورات و ١٨٨٠ مل محلول ملحى . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٨,٤ - ٨,٥ .

محلول ملحي مع سترات **Saline citrate**

٢,٥ مل كلوريد صوديوم ٤ مولر ، ٥,٠ مل سترات صوديوم ١ مولر ، ١٠٠ مل ماء مقطر .

محلول ملحي منظم بالباربيتال (تدريب ٨٢) **Barbital-buffered saline**

٢,٨٧٥ جم باربيتال ، ١,٠٨٣ جم باربيتال الصوديوم ، ٠,٠٨٣ جم $Ca Cl_2$ ، ٠,٢٣٨ جم $Mg Cl_2$ ، ٤٢,٥ جم Na Cl . أذب فى ٢٥٠ مل ماء مقطر دافىء . برد وخفف إلى ١٠٠٠ مل ، احفظ فى الثلاجة . عند الاستعمال خفف جزءًا واحدًا إلى أربعة أجزاء بالماء المقطر .

محلول ملحي منظم بالفوسفات (تدريب ٦٠)

Phosphate-buffered saline, PBS

لكل لتر :

(أ) ٨,٠ جم Na Cl ، ٠,٢ جم K Cl ، ٠,١٣٢ جم $CaCl_2$-$2H_2O$ ، ٠,١ جم $Mg Cl_2$- $6H_2O$ ، ٨٠٠ مل ماء مقطر بجهاز زجاجى .

(ب) ١,١٥ جم Na_2HPO_4 ، ٠,٢ K_2HPO_4 ، ٢٠٠ مل ماء مقطر بجهاز زجاجى .
عقم كل من أ ، ب منفردًا ، برد واخلط .

محلول منظم بالبورات (تدريب ٨٢) **Borate buffer**

لكل لتر : ٦,٢ جم بوريك ، ٩,٥ جم بورات صوديوم ، ٤,٤ كلوريد صوديوم . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٨,٥ .

نسلر (تدريب ٧٤) **Nessler's reagent**

أذب ٠,٥٠- جم أيوديد بوتاسيوم فى ماء مقطر ، ضف محلولاً مشبعًا من كلوريد الزئبقيك ، إلى أن يتبقى راسب خفيف . ضف ٠,٤٠٠- مل محلول أيدروكسيد صوديوم ٥٠٪ (حجم / وزن) ، سبق ترويقه بالترسيب .

خفف إلى ١٠٠٠ مل بإضافة ماء مقطر واترك المحلول لمدة أسبوع قبل الاستعمال . يؤخذ الجزء الرائق ويحفظ فى زجاجات مغطاة جيدًا بسدادة كاوتشوك ، بعيدا عن الضوء .

جدول (أ - ٢) : خواص الدلائل المستعملة فى البكتريولوجى .

اسم الدليل (*)	٠,١ ع NaOH لكل ٠,١ جم دليل لتكوين ملح الصوديوم (مل)	التركيز الموصى به (٪ من الصبغة فى ٥٠٪ ايثانول)	نطاق الرقم الإيدروجينى الحساس	التغير فى اللون حامض ← قلو
ميتا كريزول بربل (نطاق حامضى) Meta - cresol purple	٢,٦٢	٠,٠٤	١,٢ - ٢,٨	أحمر إلى أصفر
ثايمول بلو (نطاق حامضى) Thymol blue	٢,١٥	٠,٠٤	١,٢ - ٢,٨	أحمر إلى أصفر
بروم فينول بلو Brom phenol blue	١,٤٩	٠,٠٤	٣,- - ٤,٦	أصفر إلى أزرق
بروم كريزول جرين Brom cresol green	١,٤٣	٠,٠٤	٣,٨ - ٥,٤	أصفر إلى أزرق
كلور كريزول جرين Chlor cersol green	١,٩٢	٠,٠٤	٤,- - ٥,٦	أصفر إلى أزرق
ميثايل رد Methyl red	—	٠,٠٢	٤,٤ — ٦,٤	أحمر إلى أصفر
كلور فينول رد Chlor phenol red	٢,٣٦	٠,٠٤	٤,٨ — ٦,٤	أصفر إلى أحمر
بروم كريزول بربل Brom cresol purple	١,٨٥	٠,٠٤	٥,٢ — ٦,٨	أصفر إلى بنفسجى
بروم ثايمول بلو Brom thymol blue	١,٦٠	٠,٠٤	٦,- — ٧,٦	أصفر إلى أزرق
فينول رد Phenol red	٢,٨٢	٠,٠٢	٦,٨ — ٨,٤	أصفر إلى أحمر
كريزول رد Cresol red	٢,٦٢	٠,٠٢	٧,٢ — ٨,٨	أصفر إلى أحمر
ميتا كريزول بربل (نطاق قلو) Meta cresol purple	٢,٦٢	٠,٠٤	٧,٤ — ٩,-	أصفر إلى بنفسجى
ثايمول بلو (نطاق قلو) Thymol blue	٢,١٥	٠,٠٤	٨,- — ٩,٦	أصفر إلى أزرق
كريزول فثالين Cresol phthalein	٢,٨٩	٠,٠٤	٨,٢ — ٩,٨	عديم اللون إلى أحمر
فينول فثالين Phenolphthalein	—	٠,٠٥	٨,٣ — ١٠,٠	عديم اللون إلى أحمر

(*) لتحضير المحلول المائى للدليل .. ضف الكمية المبينة من أيدروكسيد الصوديوم ٠,١ ع إلى ٠,١ جم من الدليل ، اسحق جيدا فى هاون ، ثم ضف ٥٠٪ إيثانول إلى ٢٥٠ مل (تركيز الدليل = ٠,٠٤٪) .

البيئـــات
Media

APT آجار (تدريب ٥٠) **APT (All purpose tween) agar**

APT مرق + ١,٥٪ آجار .

APT مرق (تدريب ٥٠) **APT broth**

لكل لتر : ٧,٥ جم مستخلص خميرة ، ١٢,٥ جم تربتون ، -١٠,- جم دكستروز ، -٥,- جم سترات صوديوم ، ٠,٠٠١ جم ثيامين هيدروكلورايد ، -٥,- جم كلوريد صوديوم ، -٥, جم فوسفات ثنائى البوتاسيوم ، ٠,١٤ جم كلوريد منجنيز ، ٠,٨ جم كبريتات مغنسيوم ، ٠,٠٤ جم كبريتات حديدوز ، ٠,٢ جم sorbital monooleate complex .

APT مرق مع دليل بروم كريزول بربل (تدريب ٥٠) **APT, BCP, broth**

٢ مل محلول دليل BCP لكل لتر مرق APT .

APT وكربونات كالسيوم (تدريب ٥٠) **APT Ca CO_3**

ضف ٠,٣٪ كربونات كالسيوم معقم إلى APT آجار ، وزع مع التقليب المستمر .

آجار

آجار بيئة ثلاثية السكريات مع حديد (تدريب ٤٤)
Triple-sugar iron agar, (TSI agar)

لكل لتر : -٢٠,- جم ببتون بولى ببتون ، -٥,- جم كلوريد صوديوم ، ١٠,٠ جم لاكتوز ، -١٠,- جم سكروز ، -١,- جم جلوكوز ، ٠,٢ جم كبريتات الأمونيوم والحديدوز ، ٠,٢ جم ثيوكبريتات الصوديوم ، ٠,٠٢٥ جم فينول رد ، -١٣,- جم آجار ، p^H حوالى ٧,٣ .

آجار أزيد الصوديوم (تدريب ٤٣) **Sodium azide agar**

لكل لتر : -٥,- جم مستخلص خميرة ، -١٠,- جم تربتون ، -٥,- جم K_2HPO_4 ، -١,- جم جلوكوز ، ٠,٢ جم أزيد الصوديوم ، -١٥,- جم آجار .

آجار أكسدة وتخمر (تدريبا ٣٣ ، ٤٨) **Oxidation - fermentation agar**

لكل لتر : -,٢ جم تربتون ، -,٥ جم كلوريد صوديوم ، -,٣ جم K_2HPO_4 ، -,٢ جم آجار ، ٠,٠٨ جم بروم ثايمول بلو ، -,١ جم جلوكوز . عقم لمدة ١٠ دقائق .

آجار الرقم الأيدروجينى (تدريب ٢٦) **p^H agar**

جهز (آجار مغذى) يحتوى على ٠,٥٪ جلوكوز . قسم البيئة إلى ثلاثة أجزاء . اضبط الجزء الأول إلى p^H ٣ بإضافة حوالى ١٤ مل HCl ١ ع . اضبط الجزء الثانى إلى p^H ٤ بإضافة حوالى ٧ مل HCl ١ ع . اضبط الجزء الثالث إلى p^H ٩ بإضافة حوالى ٢٠ مل NaOH ١ ع .

عقم منفردًا كل من البيئة ، HCl ١ ع ، NaOH ١ ع ، وضف تحت شروط التعقيم .

آجار إندو (تدريب ٦٨) **Endo agar**

لكل لتر : ١٠,٠ جم ببتون ، -,١٠ جم لاكتوز ، ٣,٥ جم K_2HPO_4 ، ٢,٥ جم كبريتيت الصوديوم ، ٠,٥ جم فوكسين قاعدى ، -,١٥ جم آجار .

آجار أوكترلونى (تدريب ٨٢) **Ouchterlony agar**

أذب بالتسخين -,١٧ جم آجار منقى فى ١٩٨٠ مل محلول ملحى مع بورات borate saline . عقم . ضف ١٠ مل ١٪ مرثيولات وصب فى أطباق بترى .

آجار إيوسين وأزرق المثيلين (تدريبا ٤٣ ، ٦٨)
Eosin-methylene-blue agar (EMB)

لكل لتر : -,١٠ جم ببتون ، -,٥ جم لاكتوز ، -,٥ سكروز ، -,٢ جم K_2HPO_4 ، ٠,٤ جم إيوسين Y ، ٠,٠٦ جم أزرق المثيلين ، -,١٥ جم آجار .

آجار بطاطس وجلوكوز (تدريبا ٦٤ ، ٦٦) **Potato-glucose agar**

لكل لتر : منقوع من ٢٠٠,٠ جم بطاطس ، ٢٠,٠ جم جلوكوز ، ١٥,٠ جم آجار .

آجار بروم كريزول بربل اللاكتوز ومستخلص الخميرة
BCP lactose yeast extract agar

مثل بيئة مرق BCP اللاكتوز + ١,٥٪ آجار .

آجار تربتيكاز وصويا (تدريبا ٢٨ ، ٥٣) **Trypticase-soy agar**

مرق تربتيكاز وصويا + ١,٥٪ آجار .

آجار تك / انظر آجار سيدوموناس P **Tech agar**

آجار توليودين بلو د ن أ / انظر بيئة اختبار DNase

Toluidine blue DNA agar

آجار جلوكوز (تدريبا ٢١ ، ٦٤) **Glucose agar**

لكل لتر : آجار مغذى + ٠,٥٪ جلوكوز .

آجار جلوكوز ومستخلص الخميرة (تدريب ٢٦) **Glucose yeast-extract agar**

لكل لتر : ١٠,- جم ببتون ، ١٠,- جم مستخلص خميرة ، ٥,- جم K_2HPO_4 ، ٥,- جلوكوز ، ١٥,- جم آجار .

آجار جلوكوز ونترات وأملاح (تدريب ٣٠) **Glucose nitrate-salts agar**

لكل لتر : ١٠,- جم ببتون ، ١٠,- جم مستخلص خميرة ، ٥,- جم K_2HPO_4 ، ٥,- جم KCl ، ١٠,- جم $MgSO_47H_2O$ ، ١٥,- جم آجار .

آجار حفظ المزارع **Stock-culture agar**

لكل لتر : ١٠,- جم تربتون ، ٥,- جم مستخلص خميرة ، ٢,- جم K_2HPO_4 ، ٠,٥ جم جلوكوز ، ٠,٥ جم لاكتوز ، ١٥,- جم آجار ، ٣,- جم $Ca CO_3$.

سخن جميع المكونات عدا $Ca CO_3$. ضف $Ca CO_3$ ، ووزع فى الأنابيب مع التقليب المستمر .

آجار دم (تدريبا ٣٩ ، ٧٥) **Blood agar**

١٠,- جم تربتون ، ٣,- جم مستخلص لحم ، ٥,- كلوريد صوديوم ، ١٥,- جم آجار ، لتر ماء مقطر . عقم ، وبرد إلى ٤٥° م ، وضف ٥٪ دمًا طازجًا منزوعًا منه الفيبرين .

آجار دم وتربتوز / انظر آجار دم **Tryptose blood agar**

آجار ديزوكسى كولات (تدريب ٧٠) **Desoxycholate agar**

لكل لتر : ١٠,– جم ببتون ، ١٠,– جم لاكتوز ، ١,– جم ديزوكسى كولات الصوديوم ، ٥,– جم كلوريد صوديوم ، ٢,– جم K_2HPO_4 ، ١,– جم سترات حديديك ، ١,– جم سترات صوديوم ، ٠,٠٣ جم دليل نيوترال رد ، ١٥,– جم آجار .

آجار SIM (تدريب ٤٤) **SIM agar (Sulfide, Indole, Motility test)**

لكل لتر : ٣,– جم مستخلص لحم ، ٣٠,– جم ببتون ، ٠,٢ جم peptonized iron ٠,٠٢٥ جم ثيوكبريتات الصوديوم ، ٣,– جم آجار .

آجار سترات (بيئة سيمون ، تدريب ٤٤) **Simmon's citrate agar**

لكل لتر : ٠,٢ جم $MgSO_4$ ، ١,– جم $(NH_4)\ H_2PO_4$ ، ١,– جم K_2HPO_4 ، ٢,– جم سترات صوديوم ، ٥,– جم Na Cl ، ١٥,– جم آجار ، ٠,٠٨ جم بروم ثايمول بلو . وزع فى أنابيب الاختبار لعمل آجار مائل .

آجار سيدوموناس F (تدريب ٤٨) **Pseudomonas agar F**

لكل لتر : ٢٠.– جم بروتيوز ببتون ، ١٠,– جم مالتوز ، ١,٥ جم فوسفات ثنائى البوتاسيوم ، ٠,٧٣ جم كبريتات مغنسيوم ، ١٥,– جم آجار ، ١٠,– مل جليسرول .
(ويمكن الحصول عليه مجهزًا باسم آجار فلو من Baltimore Biological Laboratories).

آجار سيدوموناس P (تدريب ٤٨) **Pseudomonas agar P**

لكل لتر : ٢٠,– جم ببتون ، ٢,– جم الانين DL ، ١٠, – جم سترات صوديوم ، ٨,٦ جم كبريتات بوتاسيوم ، ١,٤ جم كلوريد بوتاسيوم ، ١,٤ جم كبريتات مغنسيوم ، ١٥,– جم آجار ، + ١٠, مل جليسرول .
(ويمكن الحصول عليه مجهزًا باسم آجار تك من Baltimore Biological Laboratories).

آجار طرى (تدريب ٥٦) **Soft agar**

مرق مغذى + ٧,- جم آجار فى اللتر .

آجار عد بالأطباق **Plate-count agar**

لكل لتر : ٥,- جم تربتون ، ٢,٥ جم مستخلص خميرة ، ١,- جم جلوكوز ، ١٥,- جم آجار .

آجار عد قياسية بالأطباق (تدريب ٧٠) **Standard-plate-count agar**

لكل لتر : ٥,- جم تربتون ، ٢,٥ جم مستخلص خميرة ، ١,- جم جلوكوز ، ١٥,- جم آجار . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٧,- ± ١ .

آجار عصير الطماطم (تدريب ٥٠) **Tomato juice agar**

لكل لتر : ٢٠,- جم (٤٠٠,- مل) عصير طماطم ، ١٠,- جم بيتون تربتيكاز ، ١٠,- جم peptonized milk ، ١١,- جم آجار . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ± ٦,١ .

آجار فلو / انظر آجار سيدوموناس F **Flo agar**

آجار فينايل الانين (تدريب ٣٧) **Phenylalanine agar**

لكل لتر : ٢,- جم فينايل الانين DL ، ٣,- جم مستخلص خميرة ، ٥,- جم كلوريد صوديوم ، ١,- جم Na_2HPO_4 ، ١٢,- جم آجار .
اضبط الرقم الأيدروجينى عند ± ٧,٣ .

آجار ك ف (تدريب ٦٩) **KF agar**

لكل لتر : ١٠,- جم بيتون بولى ببتون ، ١٠,- جم مستخلص خميرة ، ٥,- جم كلوريد صوديوم ، ١٠,- جم جليسرو فوسفات صوديوم ، ٠,٦٣٦ جم كربونات كالسيوم ، ٢٠,- جم مالتوز ، ١,- جم لاكتوز ، ٠,٤ جم أزيد صوديوم ، ٠,٠١٨ جم فينول رد ، ١٠,- جم آجار . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ± ٧,٢ .

آجار كاريوفانون (تدريب ٤٦) Green-top agar (Caryophanon)

٢,- جم مستخلص خميرة ، ١,- تربتون ، ١,- جم خلات صوديوم ، ٥٠,- مل مستخلص تربة ، ٢,- جم آجار ، اكمل بالماء إلى لتر ، واضبط الرقم الأيدروجينى عند ٧,٤ .

آجار كازين Casein agar

ضف ٢٪ لبنًا (فرز خام) أو لبنًا (فرز معقم) إلى بيئة آجار العد بالأطباق المجففة ، وذلك قبل التوزيع فى الأنابيب مباشرة . عقم لمدة ١٠ دقائق وبرد بسرعة .

آجار كفاف (تدريب ٥٤) Minimal agar

لكل لتر :

(أ) ٢,- جم $(NH_4)_2SO_4$ ، ١٤,- جم K_2HPO_4 ، ٦,- جم KH_2PO_4 ، ١,- جم سترات صوديوم ، ٠,٢ جم $MgSO_4 H_2O$ ، ٥٠٠,- مل ماء مقطر .

(ب) ١٥,- جم آجار نقى ، ٥٠٠,- مل ماء مقطر .

عقم كل من أ ، ب منفردًا ، بردْ إلى ٥٠° م ، إخلط أ ، ب معًا . تحت شروط التعقيم ضف المحلول المعقم التالى :

١٠ مل جلوكوز ٥٠٪ ، ١٠ مل $Mn Cl_2$ ١٠$^{-٣}$ مولر ، ٥ مل (٢ مجم / مل) تربتوفان . اخلط جيدا ، وصب فى الأطباق .

آجار كفاف وإستربتوميسين (تدريب ٥٣) Mlinimal agar and streptomycin

لكل لتر : ٣,- جم KH_2PO_4 ، ٦, - Na_2HPO_4 ، ٥, - جم $Na Cl$ ، ٢,- جم $NH_4 Cl$ ، ٠,١ جم $Mg SO_4$* ، ٨,- جم جلوكوز* ، ١٥,- جم آجار* نقى .

(* يعقم كل من $Mg SO_4$ والجلوكوز والآجار منفردًا ، ثم تضاف جميعها إلى البيئة المعقمة) . بعد التعقيم والتبريد .. أضف لكل لتر « آجار » قبل الصب بالأطباق ، ٢٠٠ مجم محلول إستربتوميسين معقمًا (١ مل من تركيز ٢٠٠ مجم / مل) .

آجار لاكتوز ومستخلص الخميرة (تدريب ٤٢) Lactose yeast extract agar

نفس التعليمات الخاصة بآجار جلوكوز ومستخلص الخميرة ، مع استبدال الجلوكوز بـ ٥,- جم لاكتوز .

آجار لبن فرز / انظر آجار كازين — **Skim-milk agar**

آجار مانيتول (تدريب ٤٤) — **Mannitol agar**

آجار مغذى + ٠,٥٪ مانيتول .

آجار مانيتول (للأزوتوباكتر) (تدريب ٧٤)
Mannitol agar (for Azotobacter)

لكل لتر : –,١٥ جم مانيتول ، ٠,٥ جم K_2HPO_4 ، ٠,٢ جم $Mg\ SO_4$ ، ٠,١ جم $CaSO_4$ ، ٠,٢ جم $Na\ Cl$ ، –,٥ جم $Ca\ CO_3$ ، –,١٥ جم آجار . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٨,٣ .

آجار مح (صفار) البيض (تدريب ٣٨) — **Egg yolk agar**

لكل لتر : يضاف ١٠٠ مل معلق ٥٪ صفار البيض إلى ٩٠٠,٠ مل بيئة آجار عد الأطباق .

آجار (أو مرق) مستخلص الخميرة التربتون (لزراعة بكتيريا حامض اللاكتيك وغيرها)
تدريبات ٢٥ ، ٣٩ ، ٥٠ ، ٧٦) — **Yeast-extract tryptone agar (or broth)**

لكل لتر : –,١٠ جم تربتون ، –,٥ جم مستخلص خميرة ، –,٥ جم K_2HPO ، –,١ جم جلوكوز . لعمل البيئة فى صورة آجار .. ضف ١,٥٪ آجار وقت إضافة الجلوكوز .

آجار مستخلص المخ والقلب مع الملح والنشا (تدريب ٧٨)
Brain-heart infusion salt-starch agar

لكل لتر : –,٣٧ جم مسحوق مستخلص المخ والقلب ، –,١٥ جم كلوريد صوديوم ، –,٥ جم نشا ، ١,٥ جم آجار .

آجار مغذى — **Nutrient agar**

مرق مغذى + ١,٥٪ آجار .

آجار مغذى مع ١,٥٪ كلوريد صوديوم (تدريبا ١٧ ، ٧٨)
Nutrient agar plus 1.5% Na Cl

لكل لتر : آجار مغذى ، –,١٥ جم كلوريد صوديوم .

آجار منجنيز (آجار التجرثم) (تدريب ٤٧) **Manganese agar**

لكل لتر : -٨,- جم مرقًا مغذيًا ، ٠,٥ مل $Mn\ Cl_2$ (-١٠,- مجم / مل محلول) ، -٢٠,- جم آجار .

آجار موللر وهنتون (تدريب ٧٧) **Mueller-Hinton agar**

لكل لتر : -٢,- جم مستخلص لحم ، ١٧,٥ جم ببتون ، ١,٥ جم نشا ، -١٧,- جم آجار .

آجار نشا (تدريب ٣٤) **Starch agar**

لكل لتر : -١٠,- جم تربتون ، -١٠,- جم مستخلص خميرة ، -٥,- جم K_2HPO_4 ، -٣,- جم نشا ذائب ، -١٥,- جم آجار .

ضف النشا إلى كمية ماء قليلة ، سخن مع التقليب المستمر حتى يذوب النشا ، استمر فى التسخين حتى الغليان ، وبسرعة ضف النشا الذائب إلى بقية المكونات .

آجار نوفوبيوسين وبنسلين وسيكلوهكسيمايد (تدريب ٤٨)
Novobiocin-penicillin-cyclo heximide agar

لكل لتر : -٤٥,- مجم نوفوبيوسين ، ٤٤,٩ مجم بنسلين ج (٧٥ ٠٠٠ وحدة) ، -٧٥,- مجم سيكلو هكسيمايد (أكتيديون) .

امزج هذه المواد فى -٣,- مل إيثانول ٩٥٪ . خفف بـ ٥٠ مل ماء مقطر معقمًا . ضف الخليط إلى لتر معقم مبرد من آجار سيدوموناس F .

بيئة Media

بيئة اختبار أيمز ـــ آجار طرى (تدريب ٨٦) **Ames test-soft agar**

٠,٦ جم آجار ، ٠,٥ جم كلوريد صوديوم ، -١٠٠,- مل ماءً مقطرًا . عقم لمدة ١٠ دقائق .

بيئة اختبار أيمز ـــ بيئة الكفاف (تدريب ٨٦) **Ames test-minimal Medium**

لكل لتر : -١٥,- جم آجار ، -٢٠,- جم جلوكوز ، ٠,٣ جم $Mg\ SO_4 . 7H_2O$ ، -٣,- جم حمض ستريك ، -١٥,- جم K_2HPO_4 ، ٥,٢٥ جم $Na\ (NH_4)\ HPO_4\ 7H_2O$ -١٠٠٠,- مل ماءً مقطرًا . عقم لمدة ١٥ دقيقة .

بيئة اختبار أيمز ــ محلول البيوتين والهستيدين (تدريب ٨٦)
Ames test - biotin - histidine solution

٠,٠١٢٢ جم بيوتين ، ٠,٠٠٧٧ جم هستيدين هيدروكلوريد ، -,١٠٠٠ مل ماءً مقطرًا . عقم لمدة ١٠ دقائق .

بيئة آجار اختبار الإنزيم المحلل لد د. ن. أ (تدريب ٧٦) DNase-test agar

لكل لتر : ٠,٣ جم DNA ، -,١ مل $Ca Cl_2$ ، ٠,٠١ مولر ، -,١٠ جم Na Cl ، -,١٠ جم آجار في ٠,٠٥ مولر منظم Tris (p^H -,٩) .

بعد غليان الخليط لإتمام إذابة د ن أ والآجار ، ضف -,٣ مل من ٠,١ مولر Toluidine blue O .

بيئة اختزال النترات (تدريب ٧٤) Nitrate - reduction medium

لكل لتر : -,١٠ جم casitone ؛ -,٣ جم مستخلص خميرة ، -,٢ جم نترات بوتاسيوم ، p^H ٧,١ .

بيئة التحول الوراثى (تدريب ٥٥) Transformation medium

لكل لتر : تحت شروط التعقيم ، اخلط المحاليل التالية المعقمة :

-,١٠٠ مل $Mg SO_4$ ، ٠,٠٥ مولر ، -,١٠٠ مل Casein hydrolysate ٠,١٪ خالٍ من الفيتامينات والأملاح ، -,١٠٠ مل تربتوفان (٥٠ ميكروجرام / مل) ، -,٧٠٠ مل جلوكوز ٥٠٪ ، ٢,٥ مل هستيدين (٢ مجم / مل) .

بيئة الكولوباكتر (تدريب ٤٦) Caulobacter medium

-,٢ جم ببتون ، -,١ جم مستخلص خميره ، ٠,٢ جم $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ ، -,١٠ جم آجار - لكل لتر ماء حنفية .

بيئة إنتاج البنسلين (تدريب ٣٠) Penicillin-production medium

لكل لتر : -,٣٦ جم مسحوق شرش ، -,١٠ جم $Ca Co_3$ ، ١,٥ جم خلات صوديوم ، -,٥ جم KH_2PO_4 ، -,١٠ جم جلوكوز ، ٠,٠٤ جم $Mg SO_4 - 7H_2O$ ، ٠,٠٤ جم $Zn SO_4$ ، -,٢ جم $(NH_4)_2 SO_4$.

(وقد تستعمل أيضا بيئة آجار اللبن المفرز) .

بيئة إندو المعدلة (تدريب ٦٩) **Endo medium, modified**

لكل لتر : -,٢٠ جم لاكتوز ، -,٢٠ جم ببتون ، -,٧ جم K_2HPO_4 ، -,٥ جم كبريتيت صوديوم ، ٠,٨ جم فوكسين قاعدى .

بيئة إندو المعدلة M ــ مرق (تدريب ٦٩) **M- Endo broth**

لكل لتر : -,٦ جم مستخلص خميرة ، -,٢٠ جم ثيوتون ببتون ، -,٢٥ جم لاكتوز ، -,٧ جم فوسفات ثنائى البوتاسيوم ، ٢,٥ جم كبريتيت صوديوم ، -,١ جم فوكسين قاعدى ، p^H ± ٧,٥ . سخن حتى الغليان (لاتعقم) .

بيئة تربتون ومستخلص الخميرة / انظر بيئة آجار مستخلص الخميرة والتربتون
Tryptone yeast - extract medium

بيئة تريس للتقدير البيولوجى للفوسفاتيز القلوى (تدريب ٥٢)
Tris medium for alkaline phosphatase assay

محلول أ (× ١٠) : -,١٢٠ جم تريس ، -,٢٠ جم KCl ، -,٢٠ جم NH_4Cl ، ٦٠ - ٨٠ مل HCl مركز ، p^H ٧,٦ ، لتر ماء مقطر بجهاز زجاجى .

محلول ب (× ١٠٠) : -,١٠٠ ميكروجرام / مل (٠,٠١ جم / لتر) Na_2HPO_4 يضيفها الطالب .

محلول جـ (× ١٠٠) : ١,٥ مل HCl مركز ، - ,٥ جم $MgCl_2$-$6H_2O$ ، - ,٥ جم Na_2SO_4 ، ٠,٠٠٩ جم كبريتات الأمونيوم والحديدوز p^H ± ٢ ، - ,١٠٠ مل ماءً مقطرًا بجهاز زجاجى .

البيئة النهائية : -,٩٠ مل ماءً مقطرًا بجهاز زجاجى ، -,١٠ مل محلول أ ، -,١ مل محلول جـ ، ١ مل محلول جلوكوز ٢٠٪ .

وزع فى زجاجات تخفيف جديدة . راع أن تكون الأوانى الزجاجية خالية من الفوسفات بقدر الإمكان . عقم الفوسفات منفردا عن بقية مكونات البيئة . لا تعقم فى بخار يحتوى على مواد مضادة للفطريات .

بيئة تكوين النترات (تدريب ٧٤) **Nitrate-formation medium**

لكل لتر : -,١ جم $NaNO_2$ ، -,١ جم K_2HPO_4 ، -,١ جم Na_2CO_3 ، ٠,٣ جم $MgSO_4$ ، ٠,٥ جم NaCl ، ٠,٤ جم $FeSO_4$.
أذب فى ماء مقطر ، وأكمل إلى الحجم المطلوب . لا تعقم البيئة .

بيئة تكوين النتريت (تدريب ٧٤) **Nitrite - formation medium**

لكل لتر : -,٢ جم $(NH_4)_2\ SO_4$ ، -,١ جم K_2HPO_4 ، ٠,٥ - ٠,١٠ جم $Ca\ CO_3$ ، ٠,٥ جم $Mg\ SO_4$ ، ٠,٤ جم $Fe\ SO_4$.

أكمل إلى لتر واحد بالماء المقطر . لا تعقم البيئة .

بيئة ثيوجليكولات (تدريب ٢٦) **Thioglycollate medium**

لكل لتر : -,١٥ جم بولى ببتون ، -,٥ جم سيستين - L ، -,٥ جم جلوكوز ، -,٥ جم مستخلص خميرة ، ٢,٥ جم كلوريد صوديوم ، ٠,٥ جم ثيوجليكولات صوديوم ، ٠,٧ جم آجار ، p^H ٧,١ .

بيئة ديكتيو ستليوم (تدريب ٦٧) **Dictyostelium medium**

-,١٠ جم بروتيوز ببتون ، -,٥ جم مستخلص خميرة ، -,١٠ جم جلوكوز ، ٠,٣٥ جم Na_2HPO_4 ، ٠,٣٥ جم KH_2PO_4 ، أكمل بالماء إلى لتر واحد . اضبط p^H عند ٦,٤ - ٦,٦ . عقم لمدة ١٥ دقيقة ، ثم أخرج البيئة من الأوتوكلاف بأسرع ما يمكن .

بيئة جلوكوز وخلات (تدريب ٦٥) **Glucose-acetate medium**

لكل لتر : -,١ جم جلوكوز ، ٢,٥ جم مستخلص خميرة ، ٨,٢ جم خلات صوديوم (أو ٢,٣ مل حامض خليك ثلجى لكل لتر) ، -,١٥ جم آجار ، p^H ٤,٨ .

بيئة خميرة (بيئة التجرثم) (تدريب ٦٥) **Yeast sporulation medium**

لكل لتر : ٨,٢ جم خلات بوتاسيوم ، -,١ جم جلوكوز ، ٢,٥ جم مستخلص خميرة ، -,١٥ جم آجار ، p^H ٦,٧ .

بيئة خميرة (بيئة ما قبل التجرثم) (تدريب ٦٥)

Yeast presporulation medium

لكل لتر : -,٢٠ جم جلوكوز ، -,٢ جم $(NH_4)_2\ SO_4$ ، -,٢ جم $KH_2\ PO_4$ ، -,٥ جم مستخلص خميرة .

بيئة خميرة وفطر (تدريب ٦٩) **Yeast - mold medium**

لكل لتر : -,٥٠ جم سيريلوز Cerelose ، -,١٠ جم ببتون بولى ببتون ، -,٩ جم مستخلص

خميرة ، ٢,١ جم $MgSO_4$ ، –,٢ جم KH_2PO_4 ، ٠,٠٥ ، ‍ ٠ استيز ، ٠,٠٥ جم
ثيامين ، ٠,٠٢٦ جم بروم كريزول جرين ، p^H ٤,٦ .

بيئة سائل الارتطام (تدريب ٦٩) **Impingement fluid**

لكل لتر : –,٢ جم جيلاتين ، –,٤ جم Na_2HPO_4 ، –,٣٧ جم مستخلص المخ والقلب ، ٠,١ مل كحول أوكتايل . اخلط المكونات في دورق زجاجي ، اغلِ لمدة ١٥ دقيقة ، غط الدورق بدون إحكام ، واتركه ليبرد لحرارة الغرفة . يمكن تخزين السائل غير المستعمل لعدة أسابيع بالثلاجة ، في زجاجة مغطاة .

بيئة سفيروتيلاس (تدريب ٤٦) **Sphaerotilus medium**

–,٥ جم casitone ، –,١ جم مستخلص خميرة ، –,٨ مل جليسرول ، p^H –,٧ . اكمل بالماء المقطر إلى واحد لتر .

بيئة عد كلي مع دليل (تدريب ٦٩) **Total count medium with indicator**

لكل لتر : –,١٠ جم تربتيكاز ببتون ، –,٥ جم مستخلص خميرة ، –,٢ جم جلوكوز ، –,١ جم Triphenyltetrazolium chloride .

بيئة عصير التفاح (تدريب ٧٢) **Apple juice medium**

عصير تفاح تجارى (بدون مواد حافظة) + ٠,٤٪ $(NH_4)_2HPO_4$.

بيئة عصير العنب (تدريب ٧٢) **Grape juice medium**

عصير عنب تجارى (بدون مواد حافظة) + ٠,٤٪ $(NH_4)_2HPO_4$.

بيئة فوجز ــ بروسكاور / انظر مرق أحمر ميثايل وفوجزبروسكاور
Voges - Proskauer medium

بيئة كربوهيدرات ودليل أحمر الفينول (تدريب ٣٣)
Phenol - red carbohydrate medium

لكل لتر : –,١٠ جم بروتيوز ببتون ، –,٥ جم كلوريد صوديوم ، ٠,٠١٨ جم أحمر فينول ، لتر ماء مقطر . ضف –,٥ جم من المادة الكربوهيدراتية المطلوبة . p^H ٧,٤ .

بيئة كربوهيدرات ودليل أحمر الفينول لتعريف الإستافيلوكوكس (تدريب ٤٩)
Phenol-red carbohydrate medium for Staphylococcus identification

لكل لتر : ٠,٥ جم سيستين ، -٢٠,٠ جم تربتيكاز ببتون ، ٢,٥ جم آجار ، -٥,٠ جم كلوريد صوديوم ، ٠,٥ جم كبريتيت صوديوم ، ٠,٠١٧ جم أحمر فينول . ضف -٥,٠ جم من المادة الكربوهيدراتية المطلوبة . p^H ٧,٣ .

بيئة كفاف لحث الإنزيمات / انظر بيئة تريس لتقدير الفوسفاتيز القلوى
Minimal medium for enzyme induction

بيئة لاسيلليس (تدريب ٢٤) **Lascelles' medium**

لكل لتر : (أ) ٣,٨ جم صوديوم جلوتامات - L مونوهيدرات ، -٩٠٠,٠ مل ماء ، ٢,٧ جم حمض ماليك DL ، ٠,٥ جم KH_2PO_4 ، ٠,٥ جم K_2HPO_4 ، -١,٠ جم حمض نيكوتينيك ، -١,٠ مجم ثيامين -هيدروكلوريد ، ٠,١ مل بيوتين (١ مجم / ١٠ مل ماء) ، ٠,٨ جم $(NH_4)_2HPO_4$.

اضبط الرقم الأيدروجينى ليصل إلى ٦,٨ بواسطة ١ ع Na OH . عقم لمدة ١٠ دقائق .

(ب) ٢, - جم $MgSo_4 \cdot 7H_2O$,٤٠ مجم $CaCl_2$ ، -١٠٠,٠ مل ماء .

اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٦,٨ بواسطة ١ ع NaOH عقم لمدة ١٠ دقائق .

تحت شروط التعقيم .. اخلط أ ، ب .

بيئة لبن **Milk, plain**

عقم لبنًا فرزًا لمدة ١٠ دقائق .

بيئة لبن عباد الشمس (تدريب ٤١) **Milk, litmus**

ضف كمية كافية من دليل عباد الشمس azolitmin (٢,٥٪ محلول مائى) ، إلى لبن فرز طازج ؛ ليعطى لونًا بنفسجيًا فاتحاً . عقم لمدة ١٢ دقيقة على ١٥ رطل / بوصة٢ ، وبَرِّدْ بسرعة فى الماء عقب رفع البيئة من المعقم .

بيئة MIO (تدريب ٤٤) MIO (motility, indole, ornithine) medium

لكل لتر : -,٣ جم مستخلص خميرة ، -,١٠ جم ببتون ، -,١٠ جم تربتون ، -,٥ جم أورنيثين - L هيدروكلوريد ، -,١ جم جلوكوز ، -,٢ جم آجار ، ٠,٠٢ جم بروم كريزول بربل .

بيئة مزارع الأنسجة (تدريب ٦٠) Tissue - culture medium

لكل لتر : بيئة Leibovitz L-15 ، ويحصل عليها من :

Grand Island Biological, 3175 Staley Rd., Grand Island, N.Y. 14072.

ضف ٠,٤ مل جنتامايسين (٥٠٠ مجم / مل) ، ٥٠ مل سيروم عجل معقم .

بيئة مزارع الأنسجة مع ميثايل سليلوز (تدريب ٦٠)

Tissue-culture medium and methyl cellulose

عقم ٠,٧٥ جم ميثايل سليلوز فى زجاجة تَسَعُ -,١٠٠ مل على الأقل . عقم لمدة ١٥ دقيقة على درجة ١٢١°م . وبعد أن يبرد .. ضف تحت شروط التعقيم - ١٠٠, مل من بيئة Leibovitz L-15 . اخلط ، ثم حضن على درجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم ضع الخليط فى الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة ، حتى يتخلل الميثايل سليلوز المحلول .

ضف جنتامايسين و ٢٪ سيروم عجل معقم كما فى بيئة مزارع الأنسجة .

بيئة ميكروباكتريوم فلاى (تدريب ١١) Mycobacterium phlei medium

لكل لتر : -,١٠٠٠ مل ماء مقطر ، ٠,٥ جم مستخلص خميرة ، -,٢ جم ببتون ، -,١ جم كلوريد صوديوم ، -,١٠ مل جليسرين ، بيضة واحدة .

اغمس البيضة بقشرتها لمدة ليلة فى كحول -,٧٠٪ . افتح البيضة تحت شروط التعقيم . مرر المحتويات بالضغط من خلال شاش معقم .

اخلط وضف الناتج إلى بقية مكونات البيئة التى سبق إعدادها وتعقيمها بالأوتوكلاف . صب فى أنابيب اختبار تحت شروط التعقيم . عقم فى وضع مائل فى حمام مائى ، على درجة ٨٠° م لمدة ساعة .

بيئة هانك ذات المحلول الملحى المتزن (تدريب ٦٠)

Hank's balanced salt solution

لكل لتر : ‎-‎،٨ جم Na Cl ، ٠,٤ جم KCl ، ٠,١٤ جم $Ca\ Cl_2$ ، ٠,١ جم $Mg\ SO_4$ ، ٠,١ جم $Mg\ Cl_2$ ، ٠,٠٦ جم Na_2HPO_4 ، ٠,٠٩ جم KH_2PO_4 ، ‎-‎،١ جم جلوكوز ، ٠,٠١ جم أحمر فينول ، ٠,٣٥ جم $NaH\ CO_3$. الماء المقطر المستعمل يكون قد سبق تقطيره ثلاث مرات .

مرق (بويون)

مرق أحمر ميثايل وفوجز بروسكاور (تدريب ٤٤) **MR-VP broth**

لكل لتر : ‎-‎،٥ جم بروتيوز ببتون ، ‎-‎،٥ جم جلوكوز ، ‎-‎،٥ جم K_2HPO_4 . لاتغير من الرقم الأيدروجينى .

مرق أورنيثين دى كاربوكسيليز **Ornithine decarboxylase broth**

لكل لتر : ‎-‎،٥ جم ثيوتون ببتون ، ‎-‎،٥ جم مستخلص لحم ، ٠,٠١ جم بروم كريزول بربل ، ٠,٠٠٥ جم أحمر كريزول ، ٠,٥ جم جلوكوز ، ٠,٠٠٥ جم بايريدوكسال . p^H ٦,٨ ، + ‎-‎،١٪ أورنيثين – L أو ٢٪ أورنيثين – DL .

مرق ببتون (تدريب ٧٤) **Peptone broth**

٤٪ محلول مائى من الببتون .

مرق بكتيريا القولون البرازية ، المعدلة (تدريب ٦٩)

M-FC broth (modified fecal coliform)

لكل لتر : ‎-‎،١٠ جم biosate peptone ، ‎-‎،٥ جم ببتون بولى ببتون ، ‎-‎،٣ جم مستخلص خميرة ، ‎-‎،٥ جم كلوريد صوديوم ، ١٢,٥ جم لاكتوز ، ١,٥ جم أملاح صفراء ، ٠,١ جم أنيلين بلو ، p^H ± ٧,٤ .

ضف ‎-‎،١٠ مل rosolic acid (١٪ فى ٠,٢ ع أيدروكسيد صوديوم) . سخن مع الرج حتى الغليان ، برد واستعمل دون تعقيم .

مرق تربتون (تدريب ٣٧) **Tryptone broth**

١٪ محلول مائى من التربتون .

مرق تربتيكاز والصويا (تدريب ٥٣) **Trypticase-soy broth**

لكل لتر : ١٧,- جم تربتيكاز ، ٣,- جم فايتون ، ٥,- جم Na Cl ، ٢,٥ جم K_2HPO_4 ، ٢,٥ جم جلوكوز . p^H ٧,٣ .

مرق تقدير النياسين حيويًا (تدريب ٢٣) **Niacin assay broth (Difco, B322)**

لكل لتر : ١٢,- جم كازين هيدرولايسيت خالٍ من الفيتامينات ، ٤٠,- جم جلوكوز ، ٢٠,- جم خلات صوديوم ، ٠,٤ جم سيستئين - L ، ٠,٢ جم تربتوفان - DL ، ٠,٠٢ جم كبريتات أدينين ، ٠,٠٢ جم جوانين هيدروكلوريد ، ٠,٠٢ جم يوراسيل ، ٠,٢ مجم ثيامين هيدروكلوريد ، ٠,٢ مجم كالسيوم بنتوثنات ، ٠,٤ مجم بيريدوكسين هيدروكلوريد ، ٠,٤ مجم رايبوفلافين ، ٠,١ مجم باراأمينو حمض البنزويك ، ٠,٨ ميكرو جرام بيوتين ، ١,- جم K_2HPO_4 ، ١,- جم KH_2PO_4 ، ٠,٤ جم $MgSO_4$ ، ٠,٠٢ جم NaCl ، ٠,٠٢ جم $FeSO_4$ ، ٠,٠٢ جم Mn SO_4 .

محلول النياسين (تدريب ٢٣) **Niacin solution**

استعمل سلسلة من الأنابيب المحتوية على ٠,٠ ، ٠,٠٢٥ ، ٠,٠٥ ، ٠,٠٧٥ ، ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٣ ، ٠,٥ ميكروجرام من محلول النياسين لكل أنبوبة بيئة . تحضر هذه المحاليل أولاً ، بإذابة ٠,١ جم من النياسين فى ١٠,- مل ماء مقطر ، لعمل محلول حفظ stock ١٠ مجم / مل . لعمل التركيزات المختلفة .. خفف محلول الحفظ بإضافة ٠,١ مل من محلول الحفظ إلى ٩٩٩,- مل ماءً مقطرًا ؛ ليعطى محلولاً تركيزه ١,- ميكروجرام / مل .

وباتباع الجدول الموضح أدناه .. جهز كميات من البيئة (٥٠٠ مل) لكل تركيز من النياسين . وزع ١٠,- مل من كل تركيز فى أنابيب اختبار (١٨ مم) ، نظيفة خالية من الخدش ، وعقم لمدة ١٢ دقيقة على درجة ١٢١° م . يجب تعقيم جميع التخفيفات بالأوتوكلاف فى نفس الوقت . الكميات الموضحة بالجدول تكفى لعمل ٥٠ أنبوبة لكل تركيز من النياسين .

جدول (أ – ٣) : بيئة تقدير النياسين حيويًا .

ميكروجرام نياسين بالأنبوبة	البيئة	ماء مقطر	نياسين (٠,١ ميكروجرام /مل)
٠,–	٢٥٠ مل	٢٥٠ مل	–
٠,٠٢٥	٢٥٠ مل	٢٣٧ مل	١٣ مل
٠,٠٥٠	٢٥٠ مل	٢٢٥ مل	٢٥ مل
٠,٠٧٥	٢٥٠ مل	٢١٢,٥ مل	٣٧,٥ مل
٠,١	٢٥٠ مل	٢٠٠ مل	٥٠,– مل
٠,٢	٢٥٠ مل	١٥٠ مل	١٠٠ مل
٠,٣	٢٥٠ مل	١٠٠ مل	١٥٠ مل
٠,٥	٢٥٠ مل	–	٢٥٠ مل

مرق تيروسين **Tyrosine broth**

لكل لتر : –١٠,– جم تربتون ، –١٠,– جم مستخلص خميرة ، –٥,– جم جلوكوز ، –٥,– جم K_2HPO_4 ، –٥,– تيروسين – L . اضبط الرقم الأيدروجينى إلى –٧,– – ٧,٢ .

مرق جلوكوز (تدريب ١٨) **Glucose broth**

لكل لتر : مرق مغذى + ٠,٥٪ جلوكوز .

مرق جلوكوز وأزيد (تدريب ٥٠) **Azide - glucose broth**

لكل لتر : –١٥,– جم بولى بيتون ، ٤,٥ جم مستخلص لحم ، ٧,٥ جم جلوكوز ، ٧,٥ جم كلوريد صوديوم ، ٠,٢ جم أزيد صوديوم .

مرق جلوكوز ومستخلص خميرة (تدريب ٢٦) **Glucose yeast-extract broth**

لكل لتر : –١٠,– جم تربتون ، –١٠,– جم مستخلص خميرة ، –٥,– جم K_2HPO_4 ، –٥,– جم جلوكوز ، اضبط الرقم الأيدروجينى إلى –٧,– .

مرق جيلاتين مغذى (تدريب ٣٦) **Nutrient gelatin**

–٤,–٪ جيلاتين فى بيئة المرق المغذى أو مرق مستخلص الخميرة والتربتون .

مرق ديكاربوكسيليز (بيئة الأساس) (تدريب ٣٧) Decarboxylase base broth

لكل لتر : ٥,- جم ببتون ثيوتون ، ٥,- جم مستخلص لحم ، ٠,٠١ جم بروم كريزول بربل ، ٠,٠٠٥ جم أحمر كريزول ، ٠,٥ جم دكستروز ، ٠,٠٥ جم بايريدوكسال pH – ٦, .

مرق إستربتوكوكاس الأساس (تدريب ٥٠) Strep-base broth

لكل لتر : ١٠,- جم تربتون ، ٥,- مستخلص خميرة ، ٢,- جم K_2HPO_4 ، ٥,- جم جلوكوز .

مرق (أو آجار) إستربتوكوكاس الأساسى مع كلوريد صوديوم (تدريب ٥٠)
Strep-base + Na Cl broth or agar

مرق إستربتوكوكاس الأسـاس + النسبة المناسبة من كلوريد الصوديوم + آجار (لبيئة الآجار) .

مرق سَيلينايت وسيستين (تدريب ٨٤) Selenite-cystine broth

لكل لتر : ٥,- جم ببتون بولى ببتون ، ٤,- جم لاكتوز ، ١٠,- جم Na_2HPO_4 ، ٤,- جم Na $HSeO_4$ ، ٠,٠١ جم سيستين – L . p^H –٧, .

مرق كربوهيدرات (جلوكوز ، لاكتوز ... وهكذا) ودليل بروم كريزول بربل
BCP Carbohydrate broth

١ – بيئة الأساس . لكل لتر : ١٠,- جم تربتون ، ٥,- جم مستخلص خميرة ، ٢,- جم K_2HPO_4 . ضف ٢,- مل دليل BCP (لتحضير محلول الدليل ، أذب ٠,٤ جم بروم كريزول بربل فى ٧,١ مل ، ٠,١ ع NaOH ، وخفف إلى لتر فى ٥٠٪ إيثانول وماء) .

٢ – اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٧,١ – ٧,٢ . وزع فى الأنابيب وعقم لمدة ١٥ دقيقة على درجة ١٢١°م (انظر الاستثناءات المبينة فيما بعد) .

٣ – يستعمل تركيز نهائى ١٪ لكل من : الجلوكوز ، اللاكتوز ، السكروز ، المانيتول . بقية الكربوهيدرات ، مثل دلسيتول ، ساليسين ، تستعمل بتركيز نهائى ٠,٥٪ . يمكن إضافة كل من : الجلوكوز ، مانيتول ، دلسيتول ، ساليسين ، أدونيتول ، أنيوسيتول ، إلى بيئة الأساس قبل التعقيم .

البيئة المحتويه على جليسرول متعادل تعقم لمدة ١٠ دقائق على درجة ١٢١° م . يجب أن تعقم السكريات الثنائية مثل لاكتوز ، سكروز ، سيللوبيوز (محلول ١٠٪ فى ماء مقطر ، p^H متعادل) بالترشيح ، أو على درجة ١٢١° م لمدة ١٠ دقائق ، ثم تضاف إلى بيئة الأساس التى سبق تعقيمها .

يجب أن تعقم الأرابينوز ، زايلوز ، رامنوز أيضا منفردة . ويعقم الرافينوز بالترشيح . إذا وزعت بيئة الأساس بكميات ٣ مل فى الأنابيب .. فضف ٠,٣ مل محلول الكربوهيدرات المائى المعقم ، أى عشر الحجم .

مرق كفاف وينكلر ودى هان (تدريب ٢٩) **Minimal broth, Winkler and De Hann**

لكل لتر :

(أ) ١٢,– جم KH_2PO_4 ، ١٢,– جم K_2HPO_4 ، ٤,– جم NH_4Cl ، ٨٠٠,٠ مل ماء . اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٦,٨ – ٧,٠ .

(ب) ١٠,–مجم $FeSO_4.7H_2O$ ، ٤٠,– جم جلوكوز ، ١٠٠,– مجم $MgSO_4.7H_2O$ ، ٢٠٠,– مل ماء . اضبط الرقم الأيدروجينى عند ٦,٨ – ٧, .

عقم كلًّا من أ ، ب منفردا ، اخلط أ ، ب ، ووزع كما هو موضح فى تدريب ٢٩ .

مرق كفاف مع ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد (تدريب ٢٩)
Minimal broth plus O.02 M sulfanilamide

جهز محلولاً ١٨ مجم / مل من السلفانيلاميد بتسخين ٥,٤ جم سلفانيلاميد فى ٣٠٠ مل ماءً مقطرًا . ضف إلى مرق الكفاف كما هو موضح بتعليمات الكتاب العملى . عقم لمدة ١٠ دقائق .

مرق كفاف مع ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد و ٢ × ١٠^{-٧} مولر باراأمينو حمض البنزويك (تدريب ٢٩)
Minimal broth plus 0.02 M sulfanilamide and 2X10^{-7} M p-amino - benzoic acid.

أذب ٩ مجم باراأمينو حمض البنزويك فى لتر ماء مقطر ، لعمل تركيز ٩ ميكروجرام / مل . عقم بالترشيح . اعمل محلولاً ١٨ مجم / مل من السلفانيلاميد بتسخين ٥,٤ جم سلفانيلاميد فى ٣٠٠,– مل ماء مقطر . تحت شروط التعقيم .. ضف كليهما إلى مرق الكفاف ، كما هو موضح بتعليمات الكتاب العملى . عقم لمدة ١٠ دقائق .

مرق كفاف مع ۰,۰۲ مولر سلفانيلاميد و ۲ × ۱۰⁻⁵ مولر باراأمينو حمض البنزويك (تدريب ۲۹)
Minimal broth plus 0.02 M sulfanilamide and 2 X 10^{-5} M p-amino benzoic acid

أذب ۹ جم باراأمينو حمض البنزويك فى لتر ماء مقطر ؛ لعمل تركيز ۹ ميكروجرام / مل . عقم بالترشيح . تحت شروط التعقيم .. خفف بإضافة ۱۰ مل من المحلول (تركيز ۹ ميكروجرام / مل) إلى ۹۰,- مل ماءً مقطرًا معقمًا ؛ لتعطى تركيز ۰,۹ ميكروجرام / مل ، ثم استعمله مع مرق كفاف السلفانيلاميد كما هو موضح بتعليمات الكتاب العملى .

مرق كفاف مع ۰,۰۲ مولر سلفانيلاميد و ۷ × ۱۰⁻⁵ مولر حمض فوليك (تدريب ۲۹) .
Minimal broth plus 0.02 M sulfanilamide and 7 X 10^{-5} M folic acid.

أذب ۰,۳-, مجم حمض فوليك فى ۱۰۰,- مل ماءً مقطرًا . عقم لمدة ۱۰ دقائق على درجة حرارة ۱۲۱°م . احفظ المحلول بعيدًا عن الضوء ، بتغطيته بورق الألومنيوم .

استعمل المحلول مع مرق كفاف السلفانيلاميد كما هو موضح بتعليمات الكتاب العملى .

مرق كفاف مع ۰,۰۲ مولر سلفانيلاميد و ۳ × ۱۰⁻³ مولر مثيونين و ۲ × ۱۰⁻⁴ مولر ثايمين و ۱ × ۱۰⁻⁴ مولر سرين و ۷ × ۱۰⁻⁵ مولر زانثين (تدريب ۲۹) .

Minimal broth plus 0.02 M sulfanilamide; methionine, 3 X 10^{-3} M; thymine, 2 X 10^{-4} M; serine, 1 X 10^{-4} M, and xanthine, 7 X 10^{-5} M.

أذب بالتسخين ۱۲,- مجم زانثين فى ٥ مل ۰,۱ ع NaOH . عادل الحموضة إلى p^H ۷,٥ . ضف ۱۲,- مجم سرين - L ، ۳٦,- مجم ثايمين ، ٦۰,- مجم مثيونين - L ، وخفف إلى ٤۰,- مل . وزع بكميات ۱,- مل ، وعقم لمدة ۱۰ دقائق . استعمل المحلول مع مرق الكفاف ، ومرق كفاف السلفانيلاميد ، كما هو موضح بتعليمات الكتاب العملى .

مرق لاكتوز (تدريب ٦۸) **Lactose broth**

لكل لتر : ۳,- جم مستخلص لحم ، ٥,- جم ببتون ، ٥,- جم لاكتوز . فى تدريب تحليل المياه ، استعمل مرق لاكتوز بتركيز مضاعف double-strength ، وذلك للأنابيب الكبيرة لمرق اللاكتوز ، والتى يضاف إليها ۱۰,- مل من عينة الماء .

مرق لايسين دى كاربوكسيليز (تدريب ٣٧)

Lysine decarboxylase broth

لكل لتر : -,٥ جم ببتون ثيوتون ، -,٥ جم مستخلص لحم ، ٠,٠١ جم بروم كريزول بربل ، ٠,٠٠٥ جم أحمر كريزول ، ٠,٥ جم جلوكوز ، ٠,٠٠٥ جم بايريدوكسال . pH نهائى ± - ,٦ + ١٪ لايسين - L أو ٢٪ لايسين - DL .

مرق مانيتول وأملاح (تدريب ٧٤) **Mannitol salts broth**

لكل لتر : -,١٥ جم مانيتول ، ٠,٥ جم K_2HPO_4 ، ٠,٢ جم $MgSO_4$ ، ٠,١ جم $CaSO_4$ ، ٠,٢ جم NaCl ، -,٥ جم $Ca\ CO_3$. اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٨,٣ .

مرق مركز ١٠ مرات (تدريب ٥٦) **Deca-strength broth**

لكل لتر : -,١٠٠ جم ببتون ، -,٥٠ جم مستخلص خميرة -,٢٥ جم NaCl ، - ,٨٠ جم K_2HPO_4 . اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٧,٦ .

مرق مستخلص المخ والقلب مع ١,٥٪ كلوريد صوديوم (تدريبا ١٧ ، ٧٨)

Brain-heart infusson broth + 1.5% Na Cl

لكل لتر : -,٣٧ جم مسحوق مستخلص المخ والقلب ، و ١٥ جم كلوريد صوديوم .

مرق مغذى **Nutrient broth**

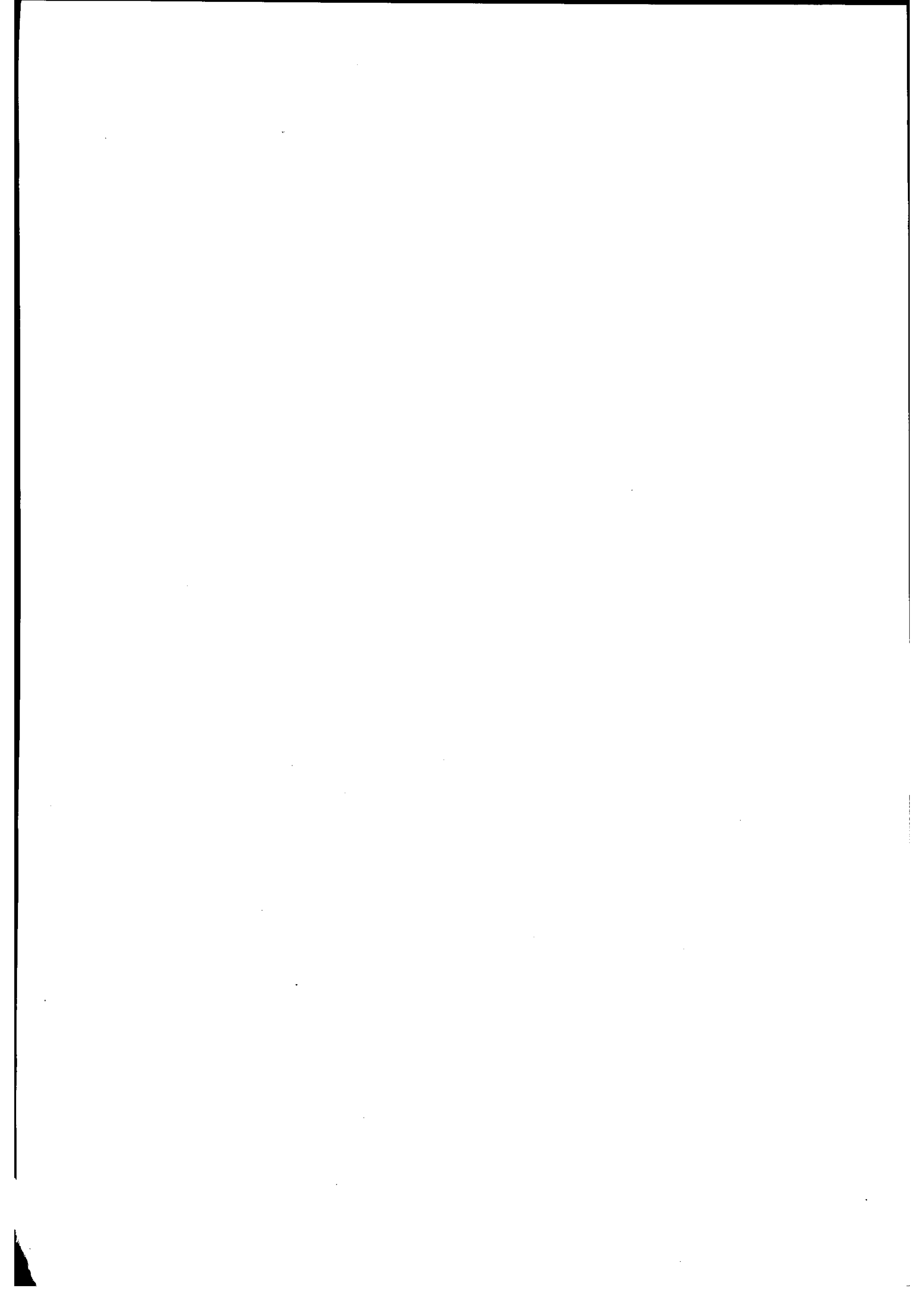
لكل لتر : -,٣ جم مستخلص لحم ، -,٥ جم تربتون ، اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٧,٠ .

مرق نترات (تدريب ٧٤) **Nitrate broth**

مرق مغذى ، أو بيئة أساس مرق الكربوهيدرات + -,٥ جم / لتر نترات بوتاسيوم أو نترات صوديوم .

مرق يوريا (تدريب ٤٤) **Urea broth**

لكل لتر : -,١ جم ببتون ، -,٥ جم NaCl ، -,١ جم جلوكوز ، -,٢ جم KH_2PO_4 ، ٠,٠١٢ جم أحمر فينول (٦ مل من محلول ١ / ٥٠٠) ، -,٢٠ جم يوريا . اضبط الرقم الأيدروجينى إلى ٦,٨ - ٦,٩ . عقم بالترشيح ، وتحت شروط التعقيم .. وزع بالأنابيب .



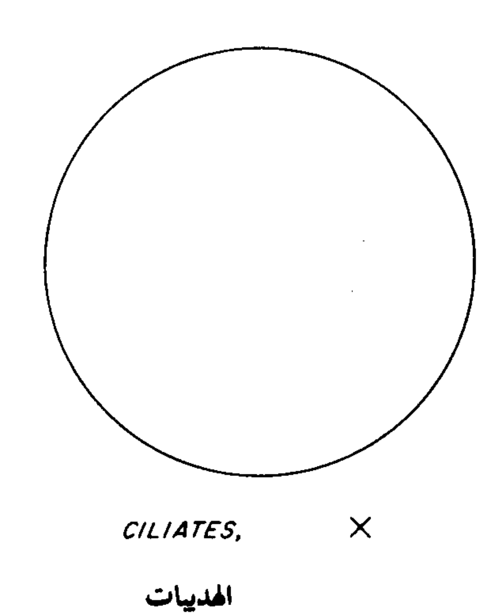
تقــريـر ١

الاســـــم : ______________

فحص السوائل الطبيعية

رقــم المعمــل : ______________

ارسم أى أنواع من الميكروبات المذكورة فيما بعد ، والتى أمكنك مشاهدتها بالفعل . اجعل رسوماتك توضح الحجم النسبى لهذه الميكروبات ، وحدد قوة التكبير التى استخدمتها فى الفحص .



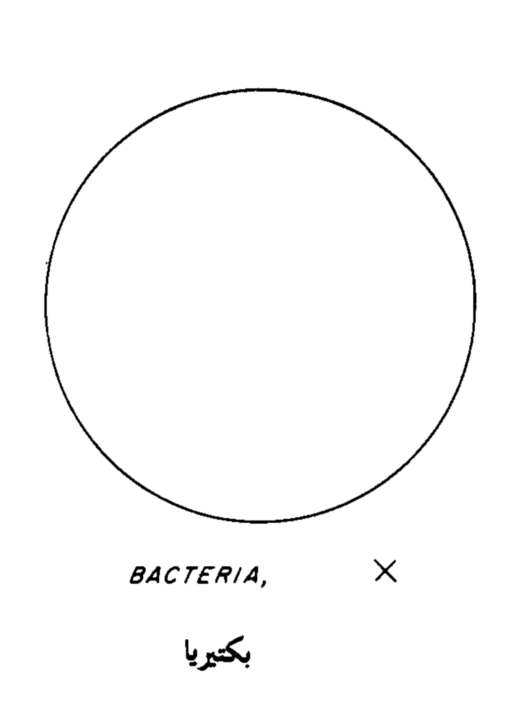
CILIATES, ×

الهدبيات



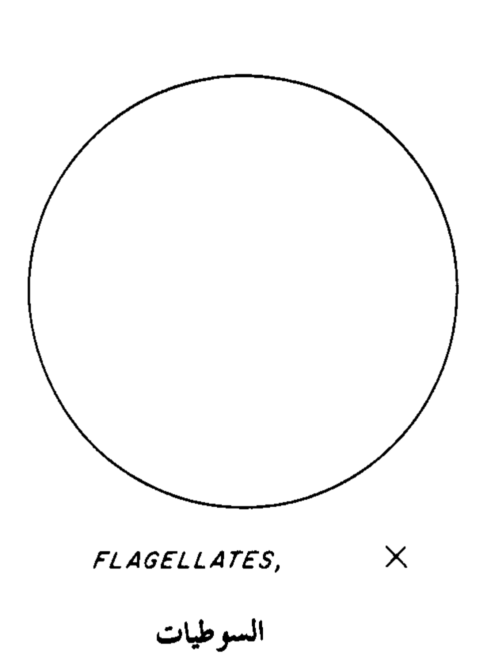
AMOEBAE, ×

الأميبا



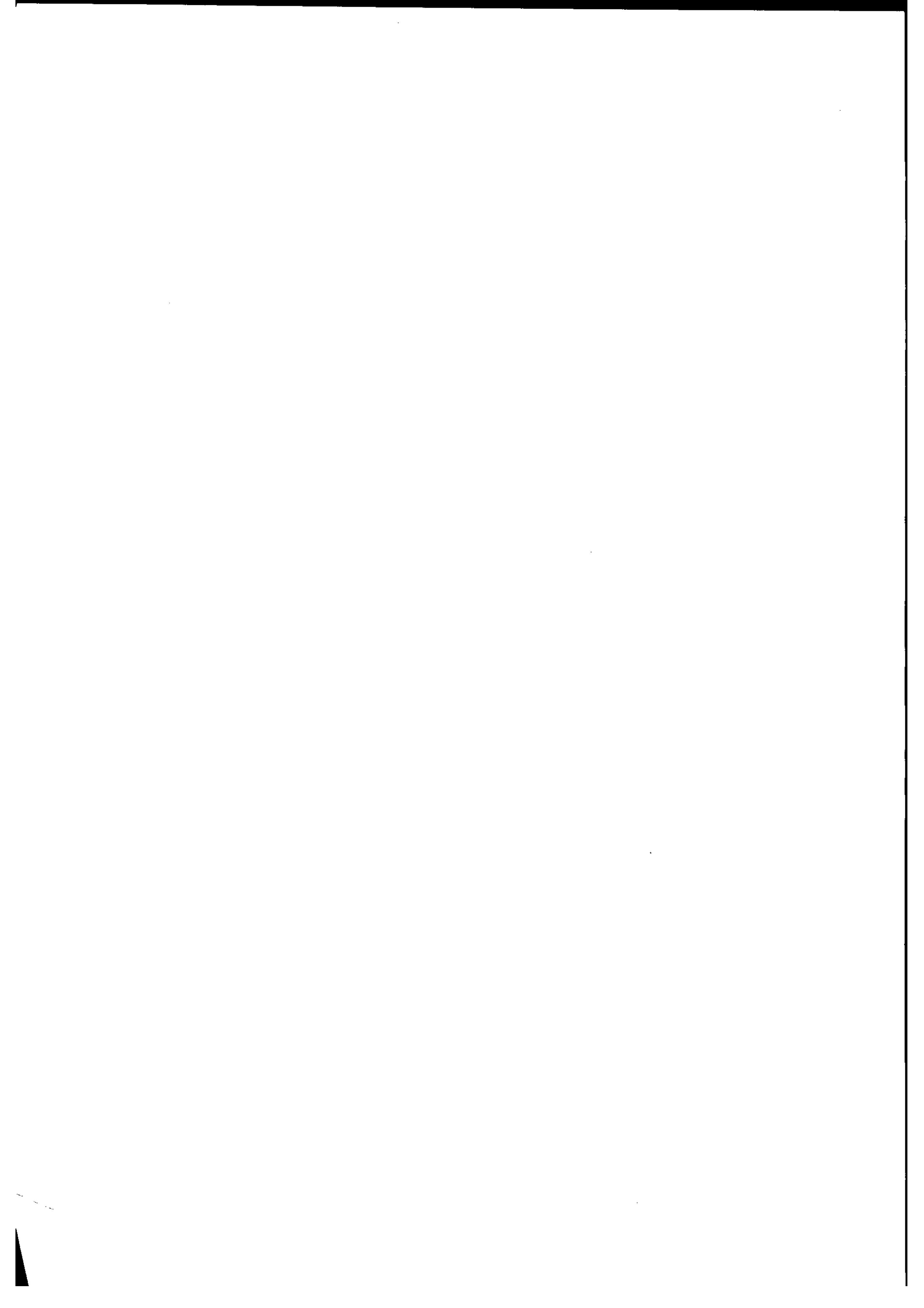
BACTERIA, ×

بكتيريا



FLAGELLATES, ×

السوطيات



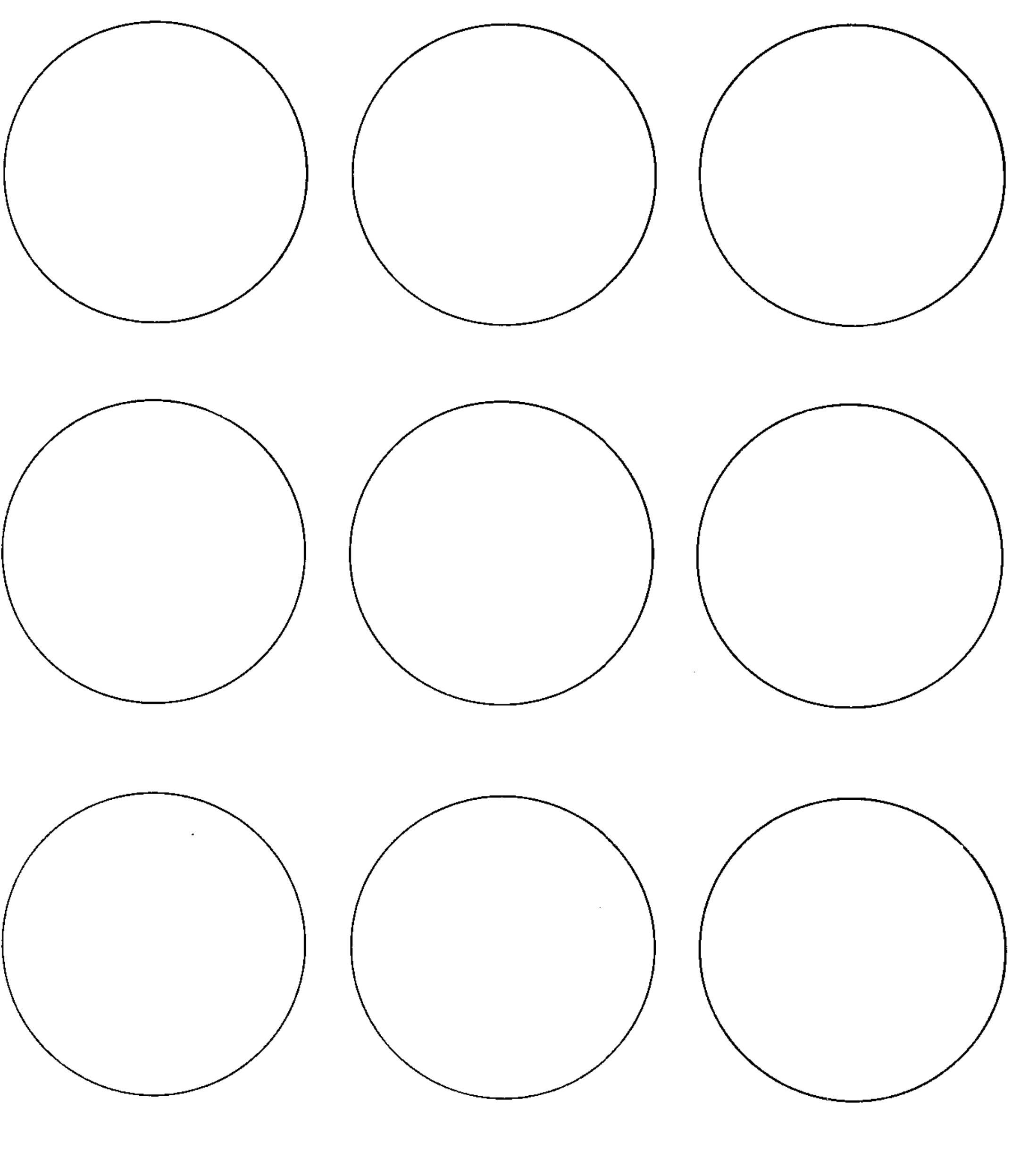
تقـــريـر ٣

فحص الخلايا المصبوغة

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

ارسم ما تشاهده . اجعل رسومك كبيرة بدرجة يمكنك بها توضيح أهم المميزات مع توضيح الحجم النسبى لما تشاهده .



قوة التكبير = ×

تقــريــر ٤

الاســـــم : ____________________

القياسات الميكروسكوبية

رقـم المعمـل : ____________________

من عملية الفحص .. اكمل ما يلى :

________ قسم من ميكرومتر العينية = ________ قسم من أقسام الشريحة الميكرومترية المسرحية

________ قسم من ميكرومتر العينية = ١ قسم من الشريحة الميكرومترية المسرحية = ________ μm.

١ قسم من ميكرومتر العينية = μm

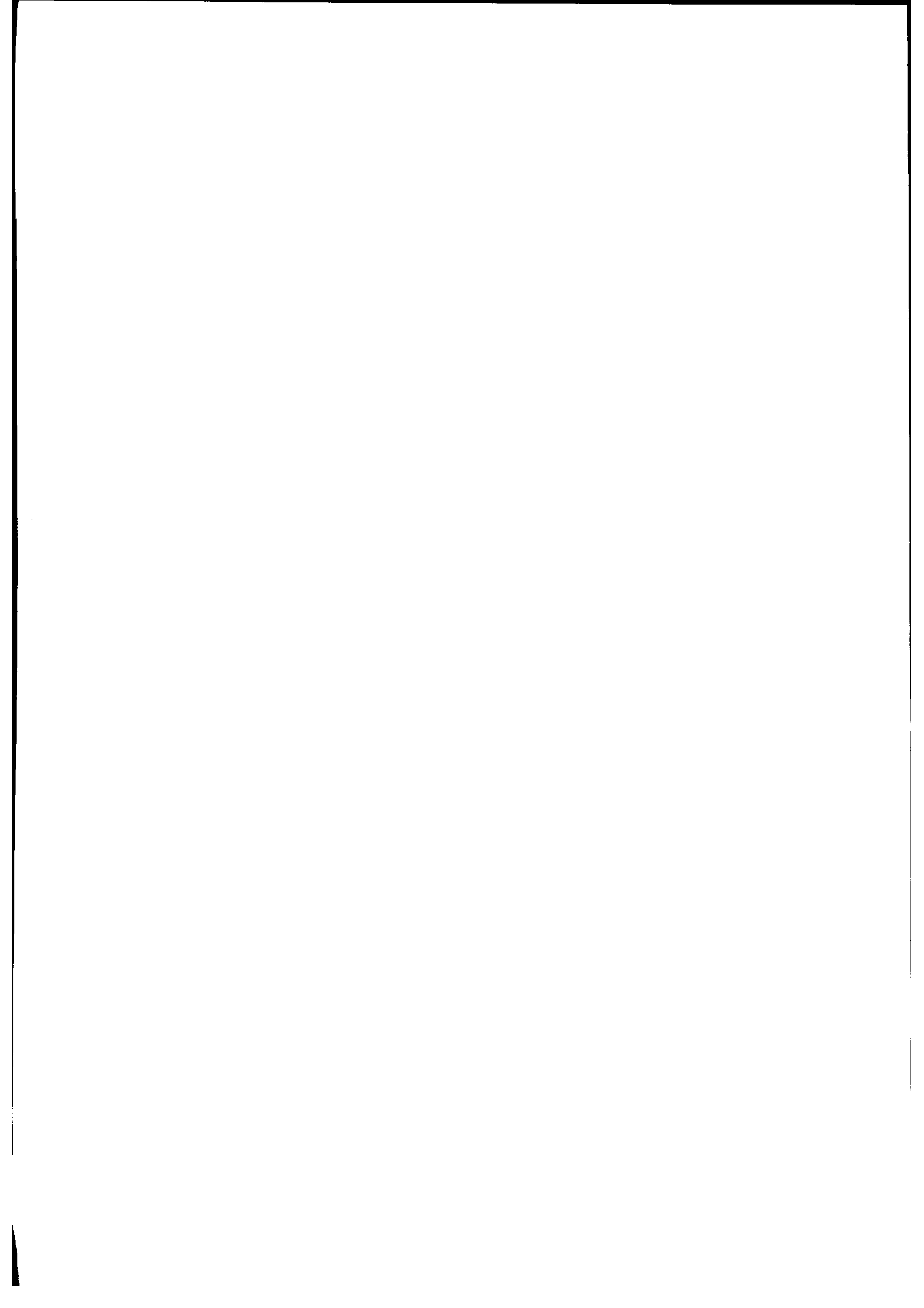
ما هى أبعاد الخلايا الميكروبية التى فحصتها ؟

خلية الخميرة = ____________________ μm

خلية البكتيريا = ____________________ μm

بروتوزوا (براميسيوم) = ____________________ μm

طحلب (يوجلينا) = ____________________ μm



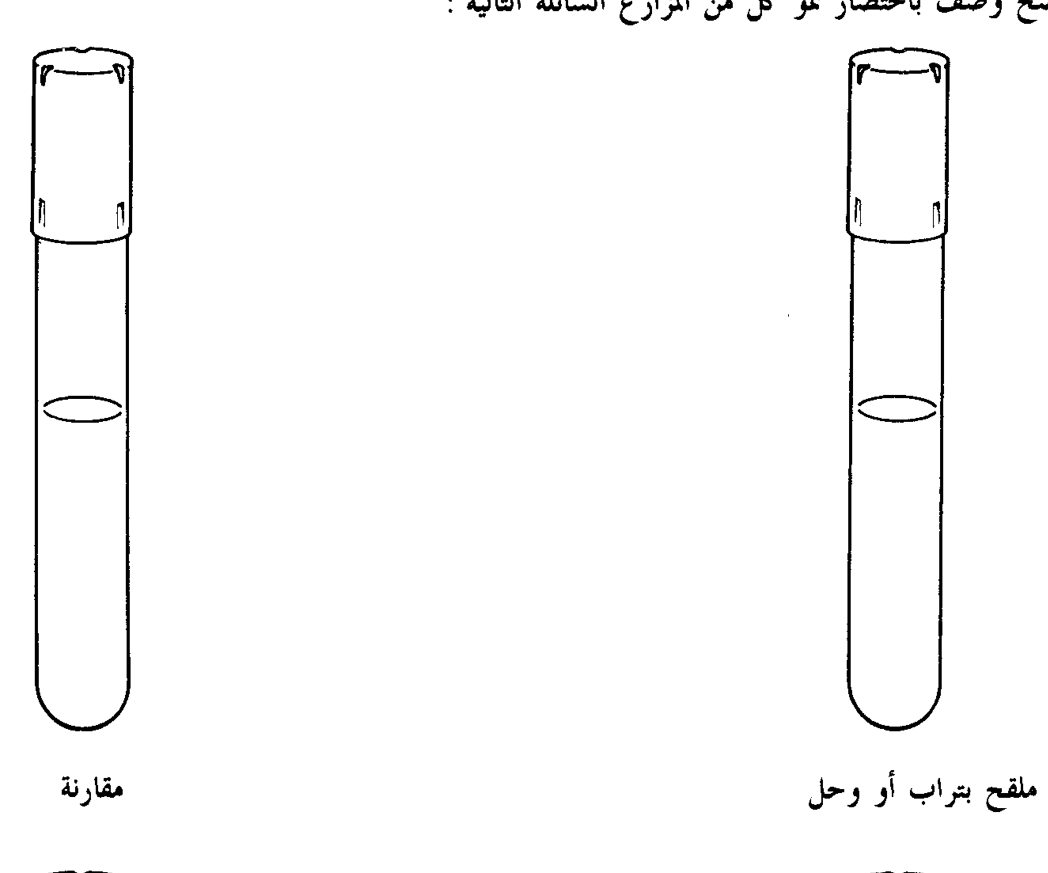
تقـــريـر ٥

الاســـــــم : ________________

المزرعة السائلة

رقـم المعمـل : ________________

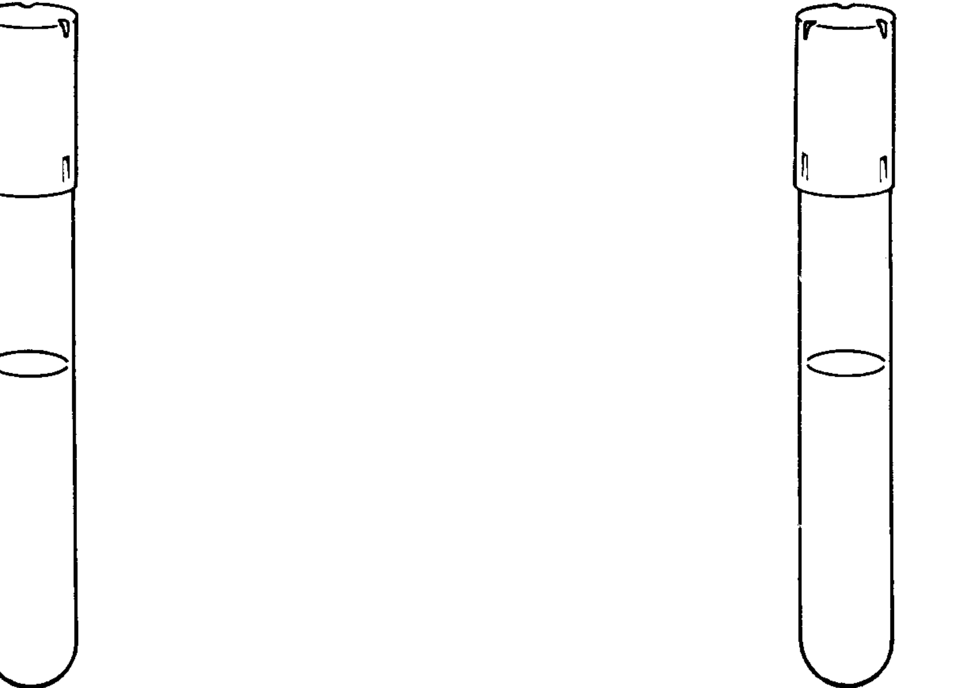
وضح وصف باختصار نمو كل من المزارع السائلة التالية :





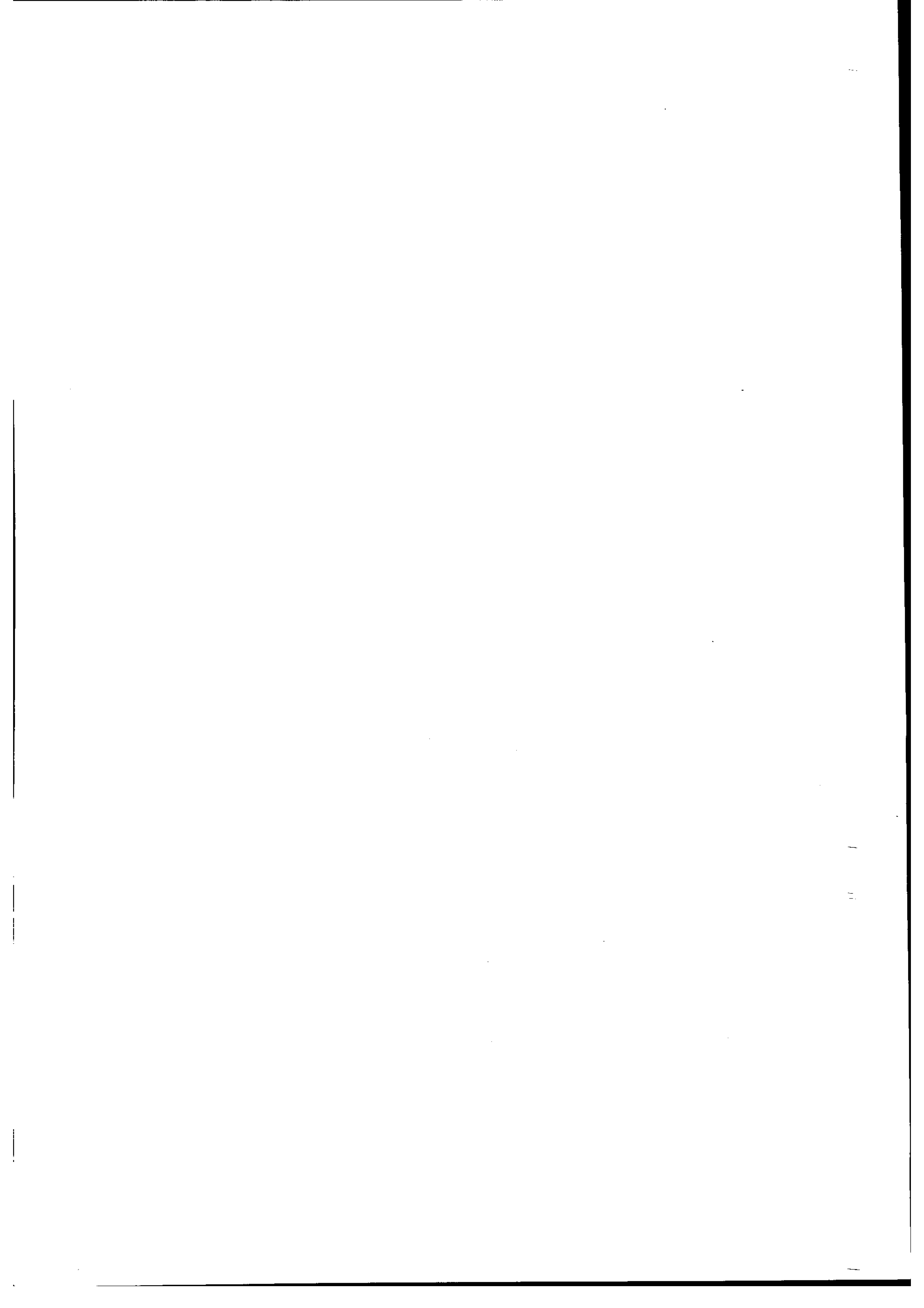
ملقح بتراب أو وحل

مقارنة



MICROCOCCUS LUTEUS

ESCHERICHIA COLI

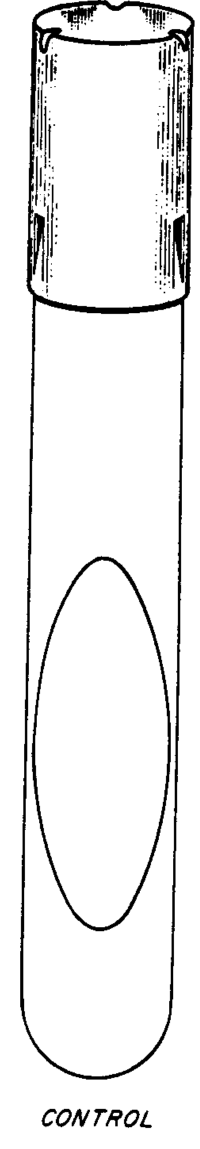


تقـــريـر ٦
مزارع الآجار المائل

الاســـــم : ____________________

رقم المعمــل : ____________________

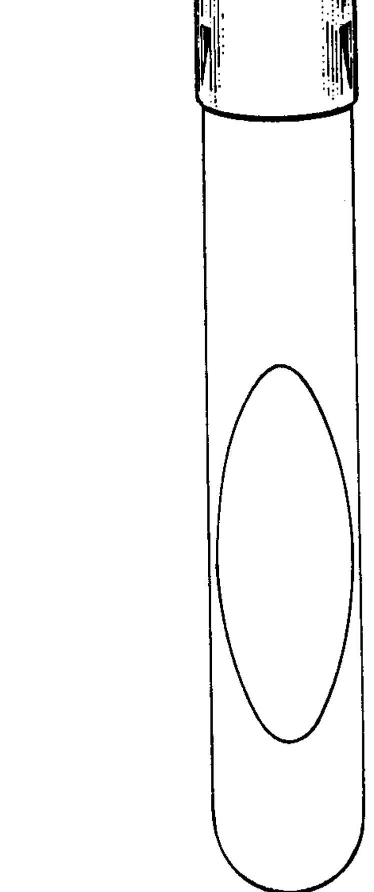
ارسم واشرح النمو الذى تشاهده .



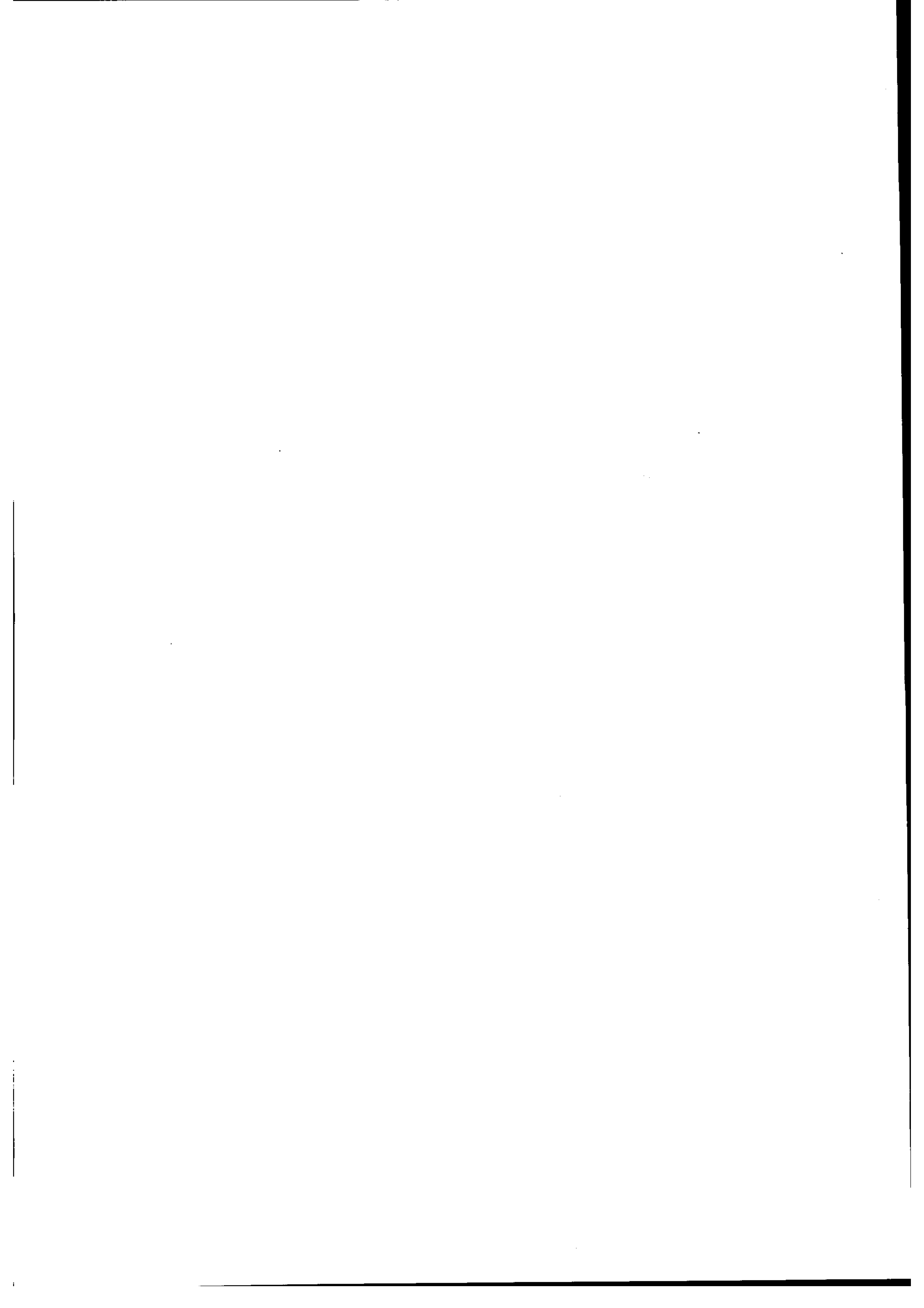
CONTROL

مقارنة

ESCHERICHIA COLI



MICROCOCCUS LUTEUS



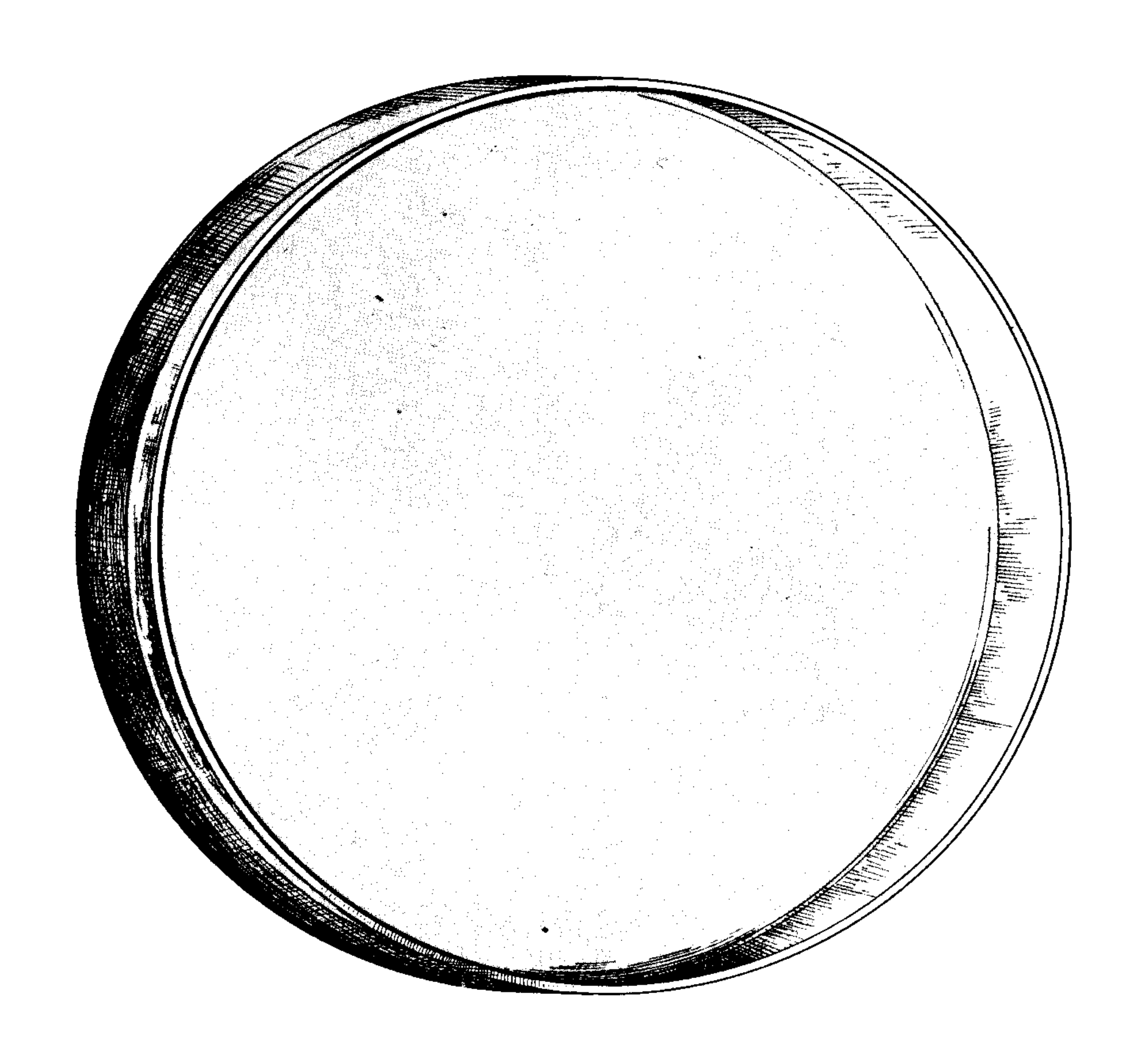
تقــريـر ٧

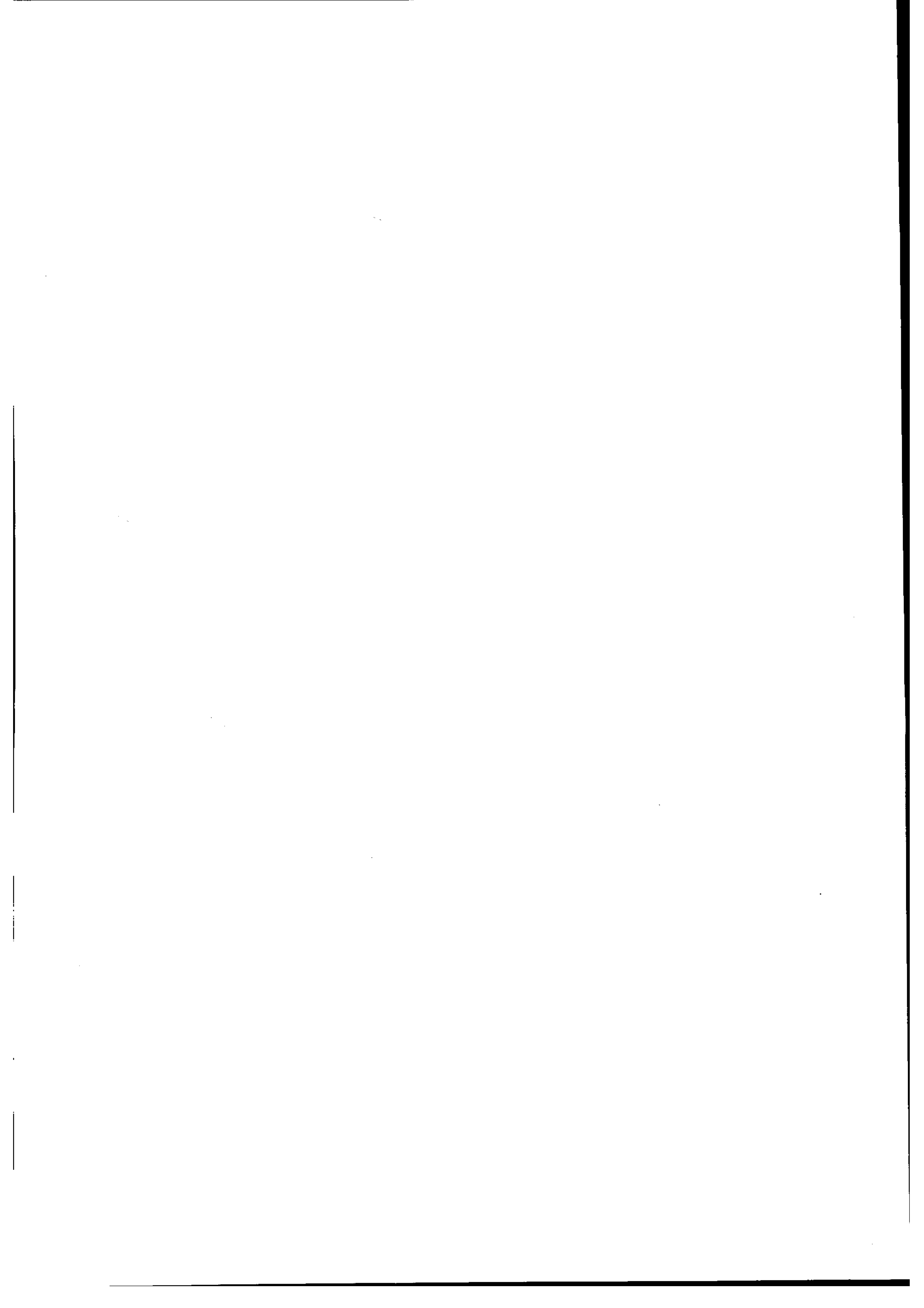
الأطباق المخطوطة

الاســـم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

ارسم النمو الذى على الطبق المخطوط ، موضحاً الاختلاف فى شكل المستعمرات - استخدم الأسهم لتوضيح اتجاه التخطيط .





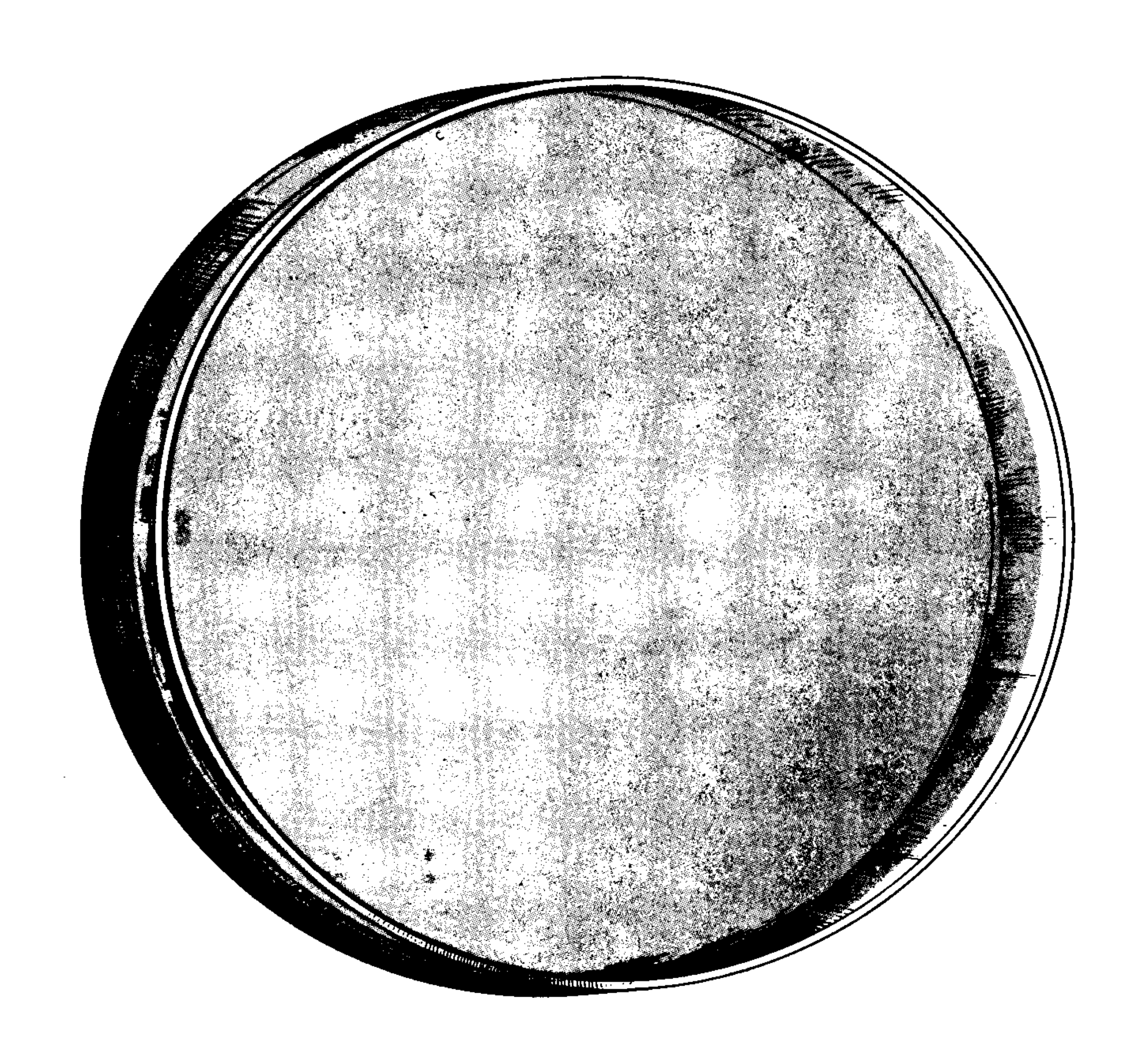
تقــريـر ٧

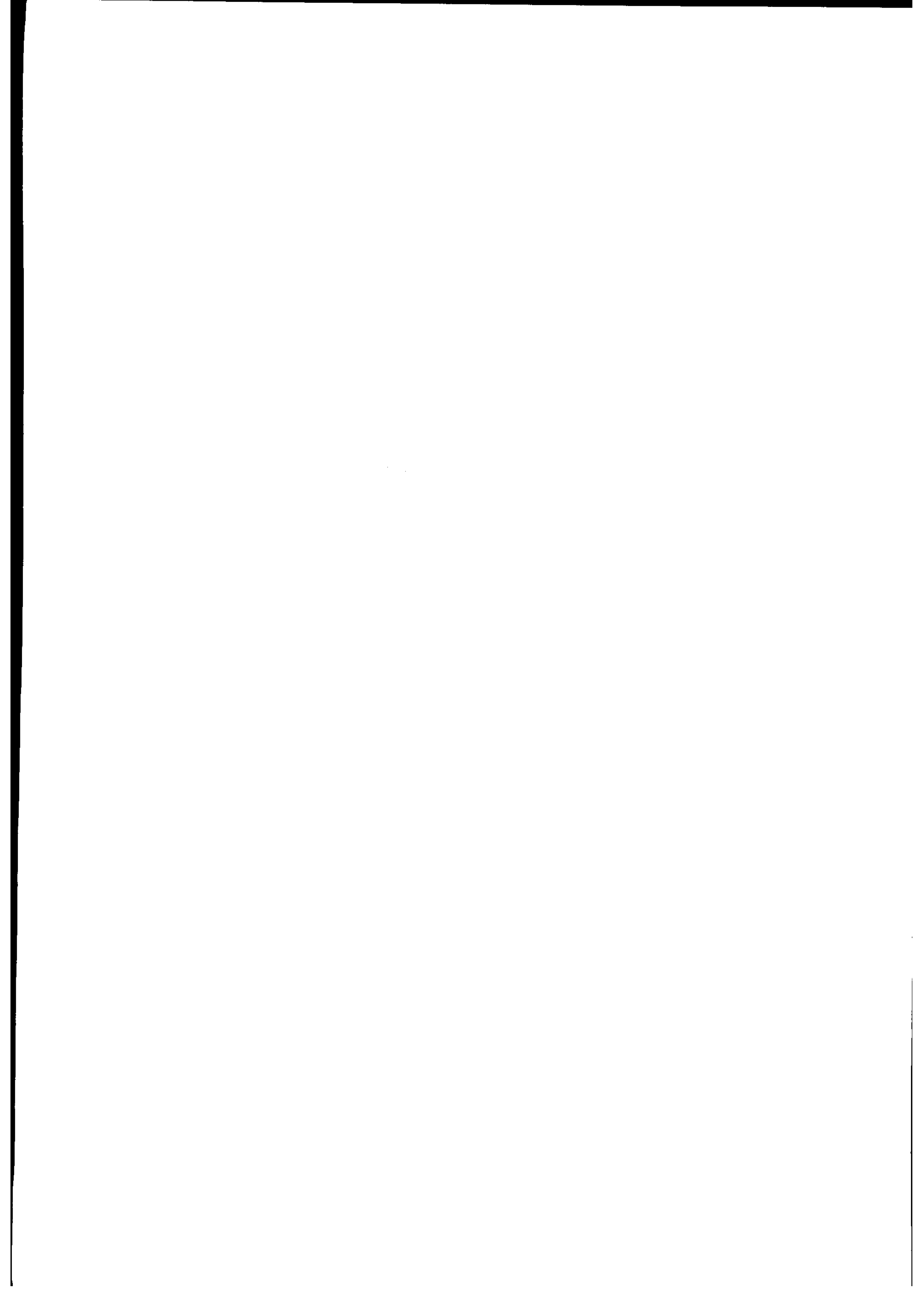
الأطباق المصبوبة

الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

ارسم شكل المستعمرات النامية ، وصف الاختلافات فى مظاهر المستعمرات .





تقــريـر ٨

الصبغ المباشر بالصبغات القاعدية

الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

ارسم ما تشاهده مع كتابة البيانات . يجب أن توضح الرسومات الميكروسكوبية الاختلاف النسبى فى الحجم والشكل ، ونظام التجمع فى السلالات المدروسة .

الشكل تحت الميكروسكوب	شكل النمو فى المرق	المزرعة
		رقم ١
		رقم ٢
		رقم ٣
		لعاب

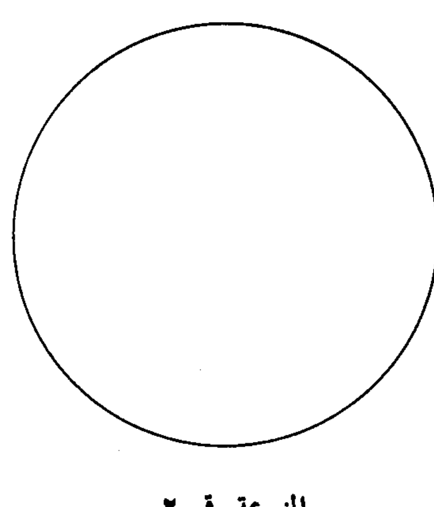
تقــريــر ٩

الاســـــم : ______________

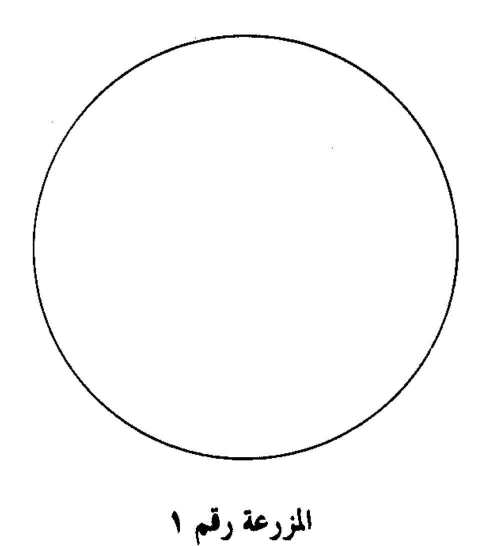
الصبغ السالب ، أو غير المباشر

رقــم المعمــل : ______________

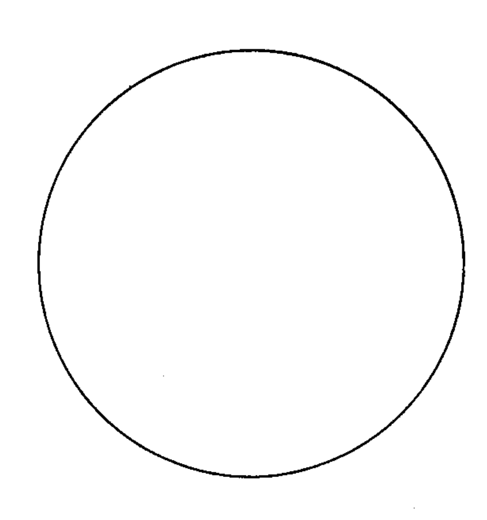
ارسم ما تشاهده باستخدام خلفية غامقة لتوضيح الخلايا غير الملونة .



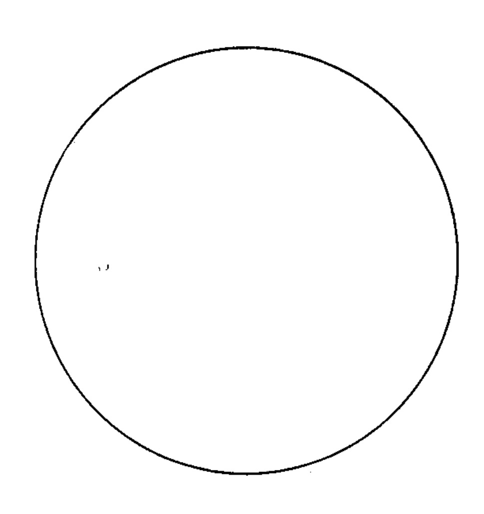
المزرعة رقم ٢



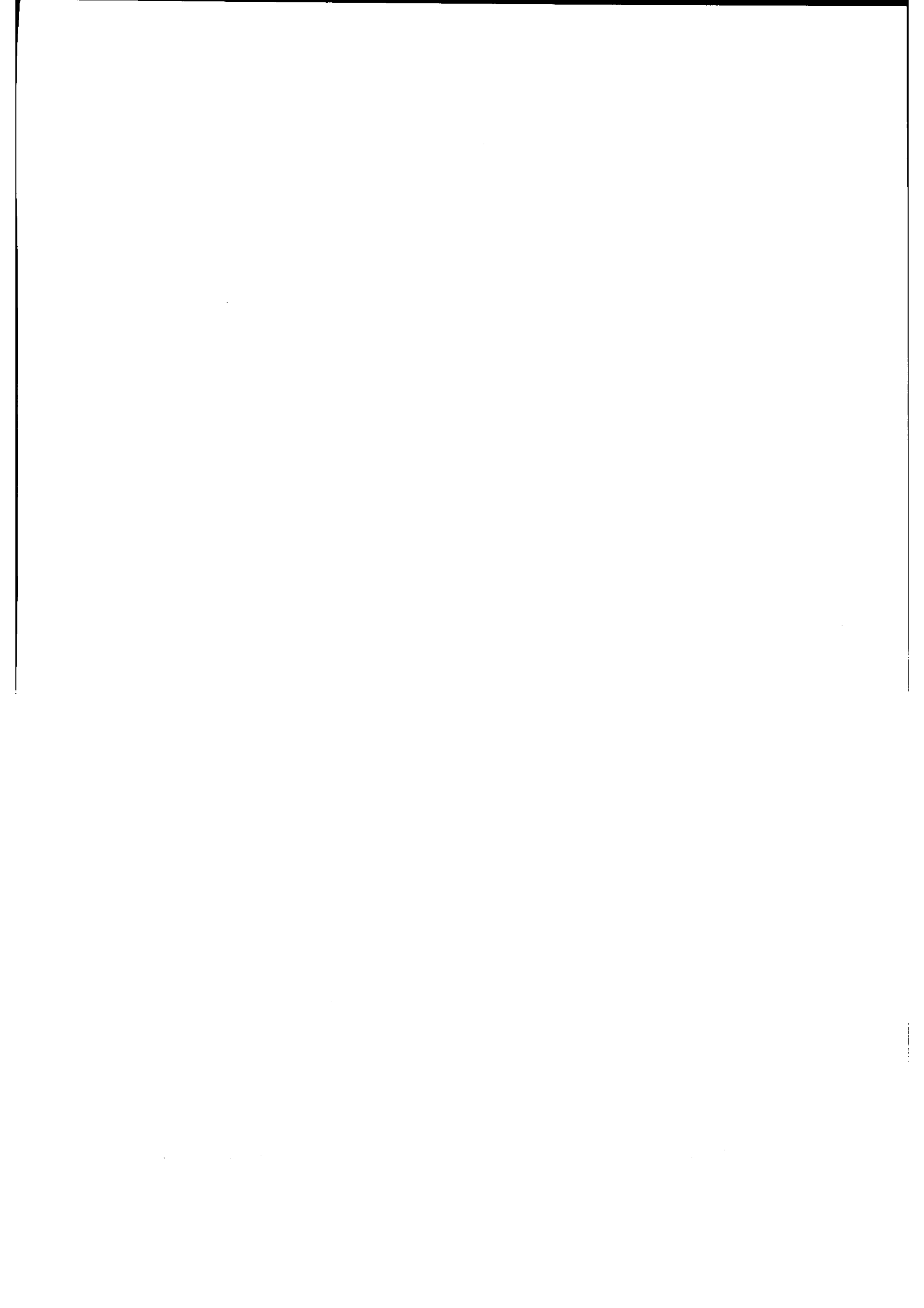
المزرعة رقم ١



المادة البيضاء المغطية للأسنان



المزرعة رقم ٣



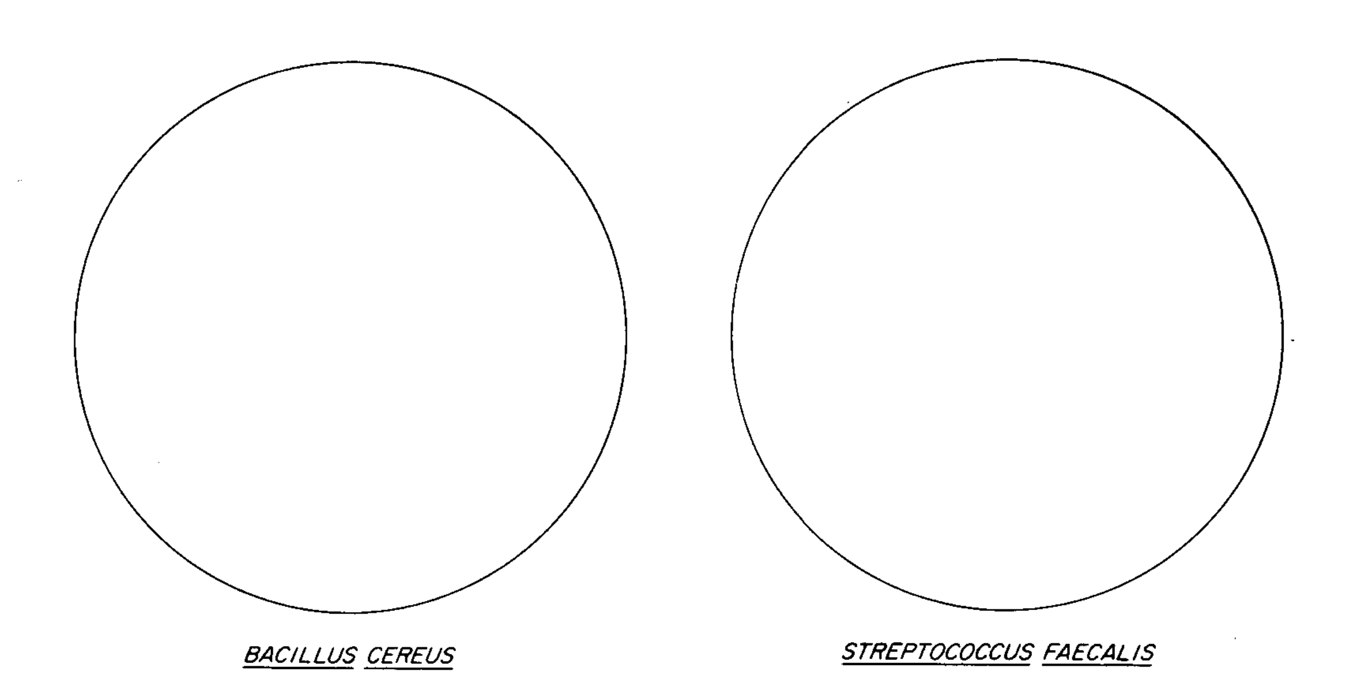
تقـــريـر ١٠

صبغة جرام

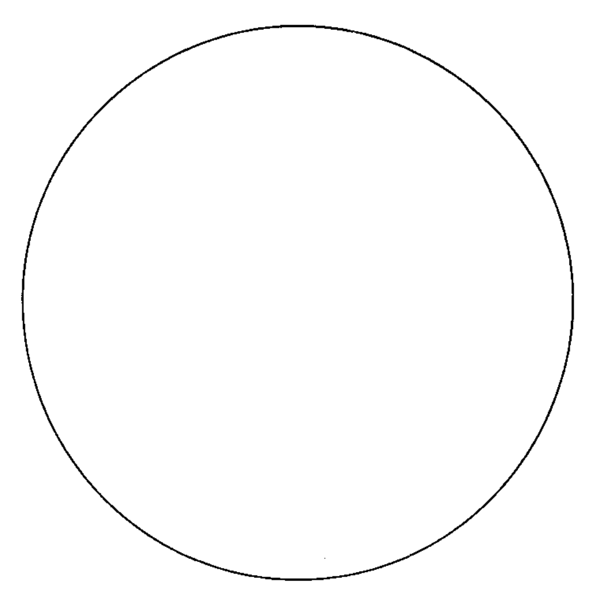
الاســـــم : ____________________

رقـم المعمـل : ____________________

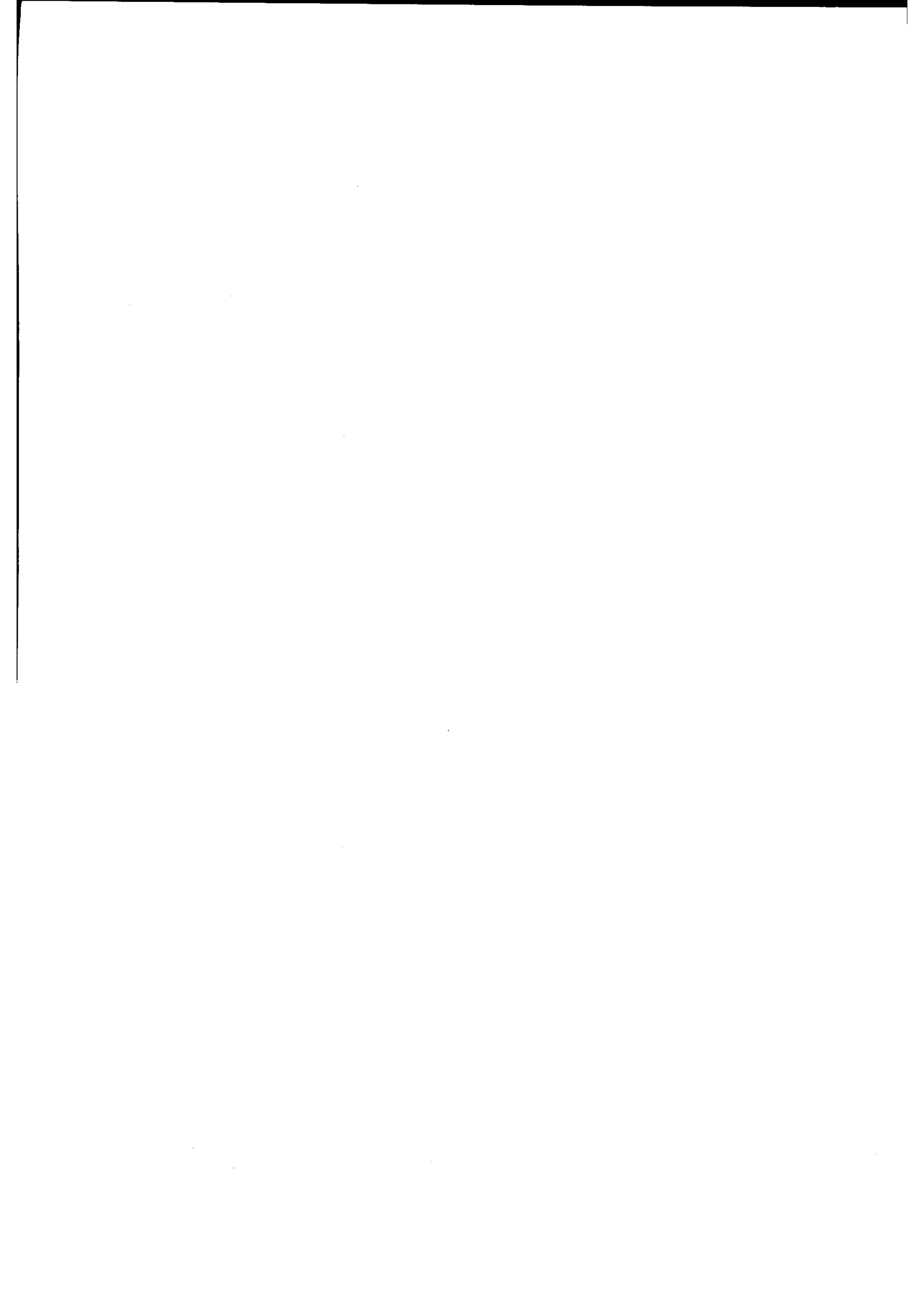
ارسم ما تشاهده باستخدام أقلام ملونة مناسبة لتوضيح تفاعل كل مزرعة مع صبغة جرام .



BACILLUS CEREUS　　　　*STREPTOCOCCUS FAECALIS*



مخلوط من المزرعتين : *ESCHERICHIA COLI* AND *MICROCOCCUS LUTEUS*



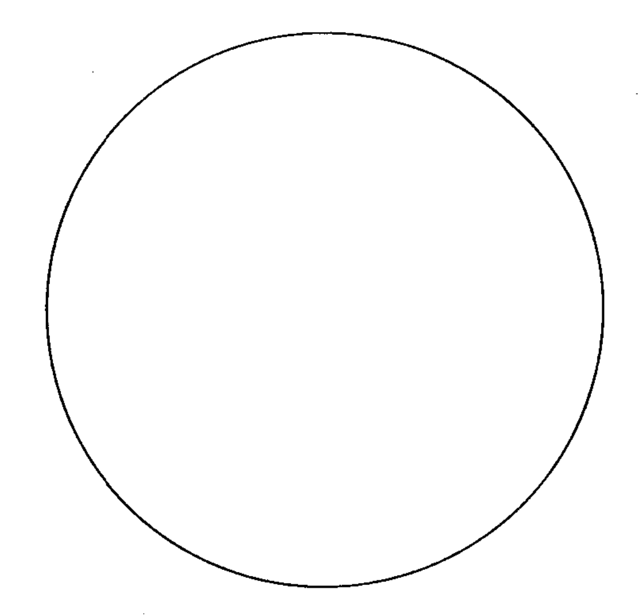
تقــريـر ١١

الصبغة الصامدة للأحماض

الاســـــم : ______________

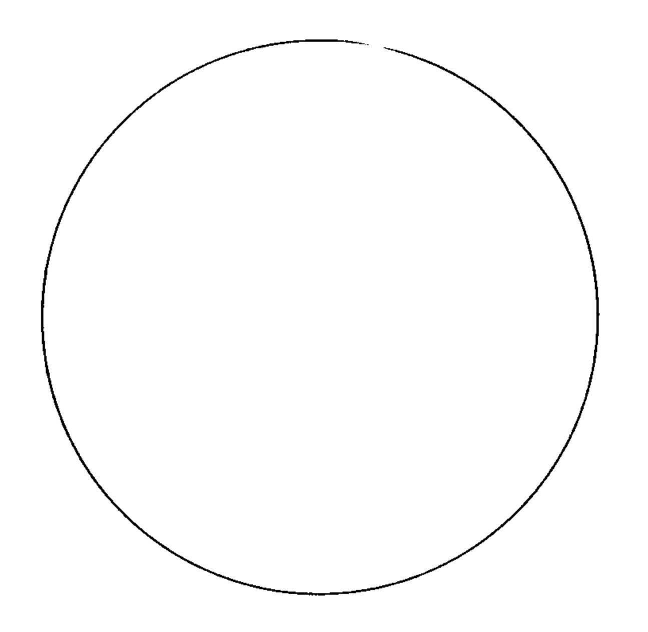
رقـم المعمـل : ______________

ارسم ما تشاهده .



TUBERCULAR SPUTUM

بصاق مريض بالسل



مخلوط من MYCOBACTERIUM AND ESCHERICHIA

تقـــريـر ١٢

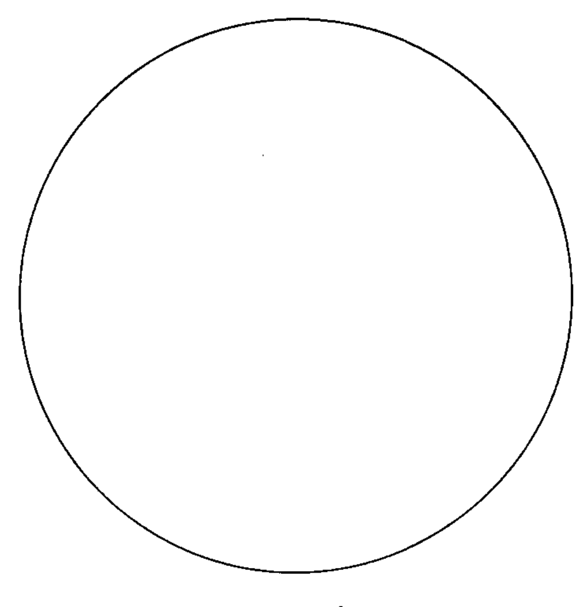
الاســــم : ________________

صبغات فحص تركيبات الخلية

رقـم المعمـل : ________________

صبغ الجراثيم الداخلية :

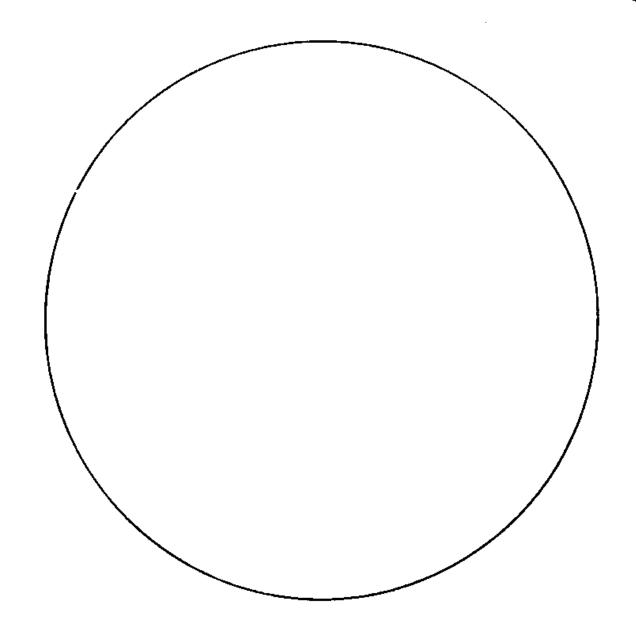
ارسم ما تشاهده مع كتابة البيانات . استخدم أقلامًا ملونة مناسبة لتوضيح الخلايا الخضرية عن الجراثيم الداخلية .



صبغة أخضر الملاكيت

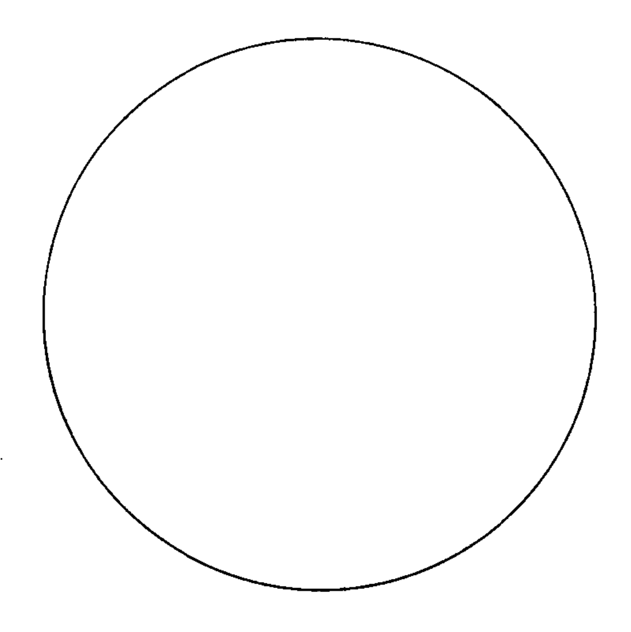
صبغ الجدار الخلوى :

ارسم ما تشاهده مع كتابة البيانات على الرسم . استخدم أقلامًا ملونة لتوضيح الجدار الخلوى .



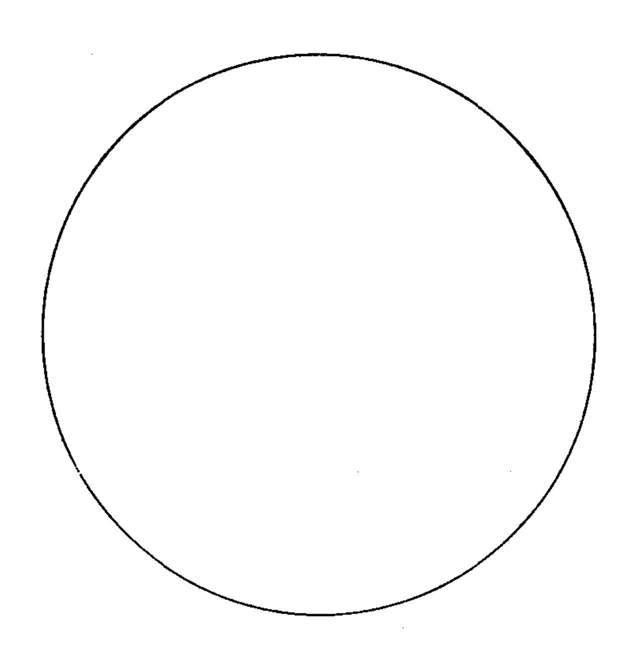
صبغ الأسواط (الفلاجلات)

ارسم ما تشاهده مع كتابة البيانات على الرسم موضحا موضع الأسواط فى الخلية .



صبغ العلبة

ارسم ما تشاهده مع كتابة البيانات على الرسم . استخدم أقلامًا ملونة للتفرقة بين الخلايا والعلبة والوسط المحيط .



تقـــريـر ١٥
العد بالأطباق

الاســــم : ________________

رقـم المعمــل : ________________

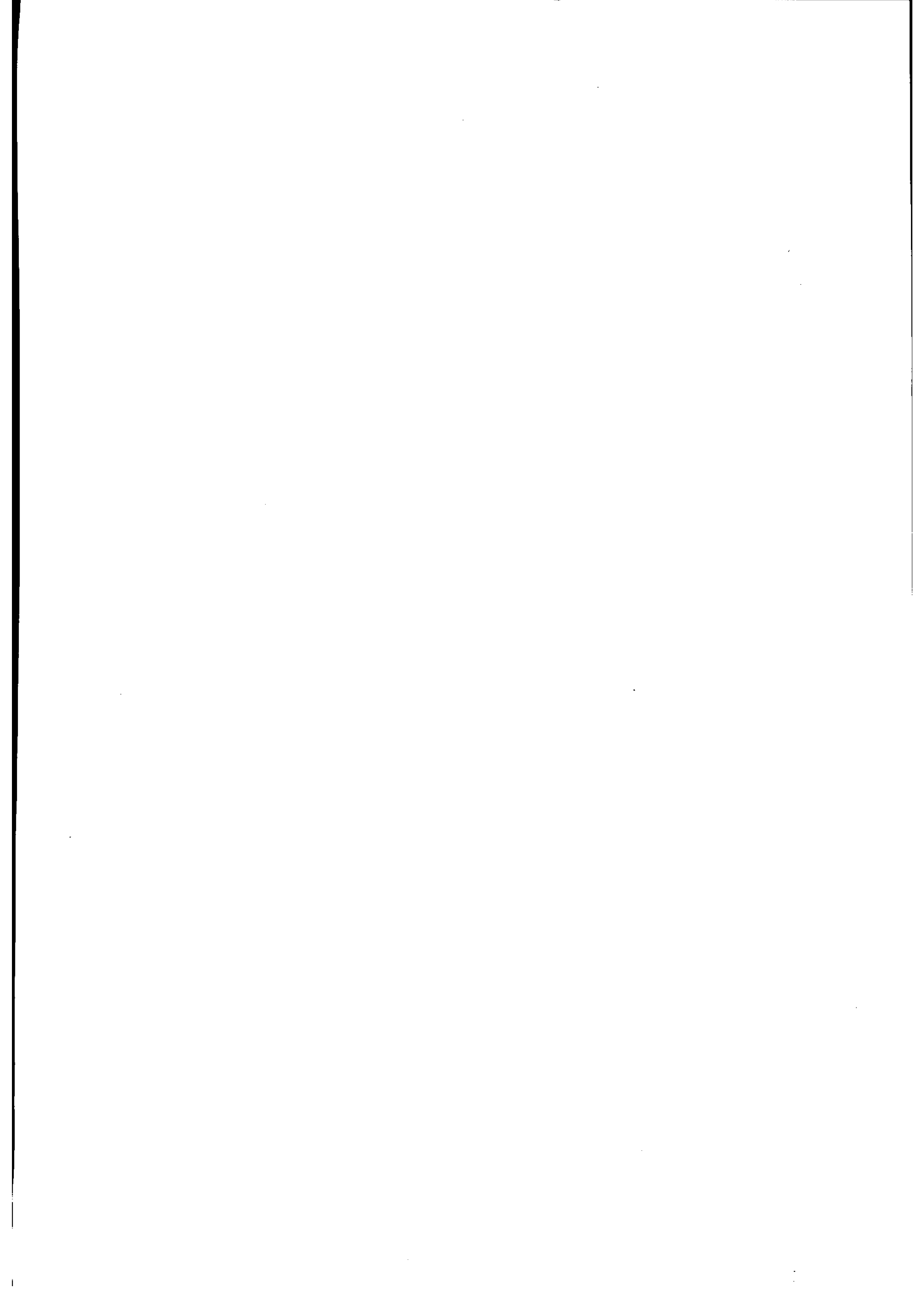
اكمل الجداول التالية :

أطباق منتشرة

	التخفيف المستخدم في العد	عدد المستعمرات	العدد الكلى لكل ملليلتر من العينة الأصلية
العينة أ			

أطباق مصبوبة

	التخفيف المستخدم في العد	عدد المستعمرات	العدد الكلى لكل ملليلتر من العينة الأصلية
العينة أ			
العينة ب			



تقــريـر ١٦

تقدير النمو البكتيرى بالتعكير

الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

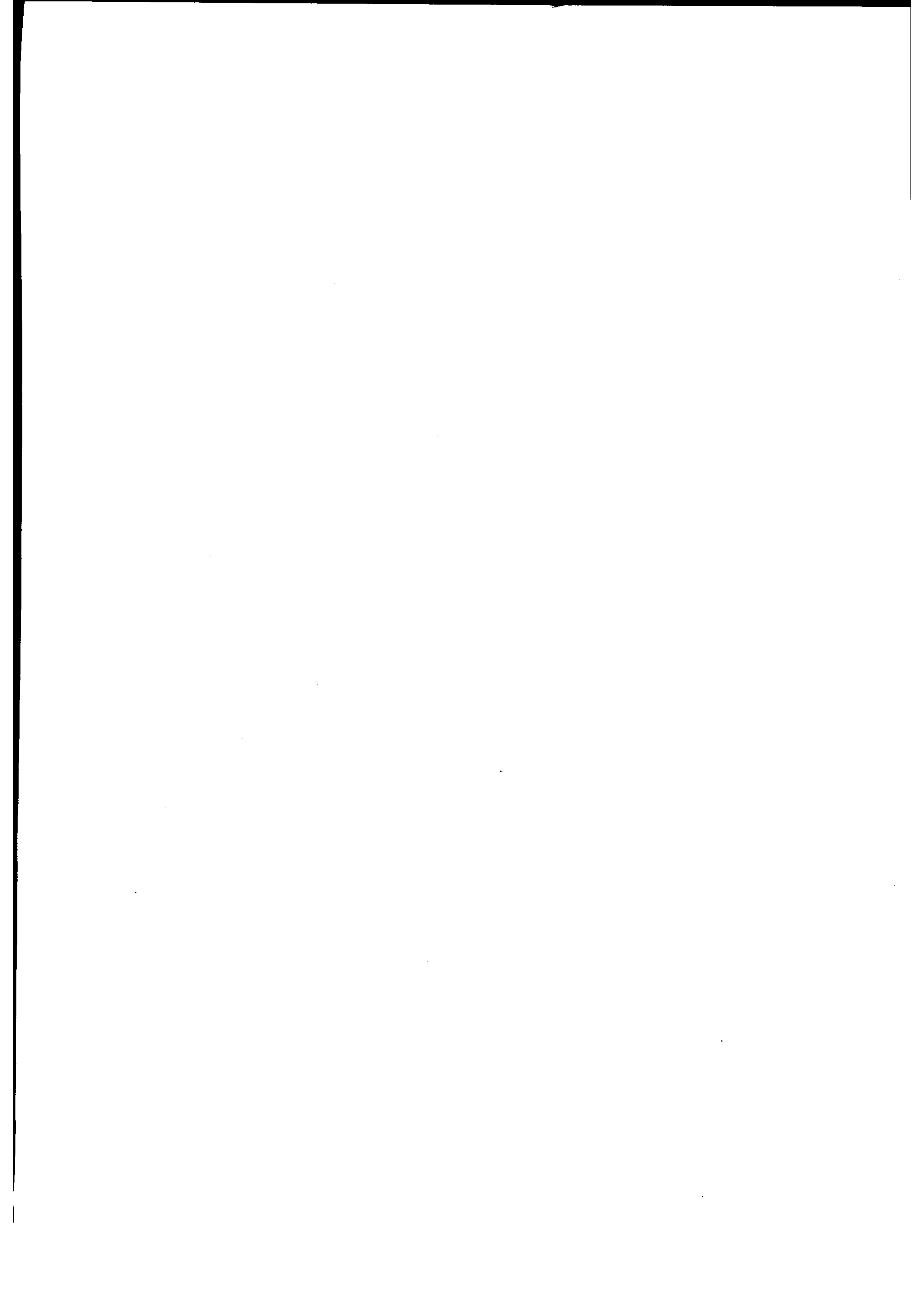
سجل كمية الامتصاص الضوئى والعد بالأطباق للتخفيفات المختلفة .

	الامتصاص الضوئى	العدد بالأطباق
عينة غير مخففة		
تخفيف ١ : ٢		
تخفيف ١ : ٤		
تخفيف ١ : ٨		
تخفيف ١ : ١٦		

ارسم العلاقة بين الامتصاص الضوئى وعدد البكتيريا

الامتصاص الضوئى

عدد البكتيريا



تقـــريـر ١٧

منحنى النمو

الاســـــم : ______________________

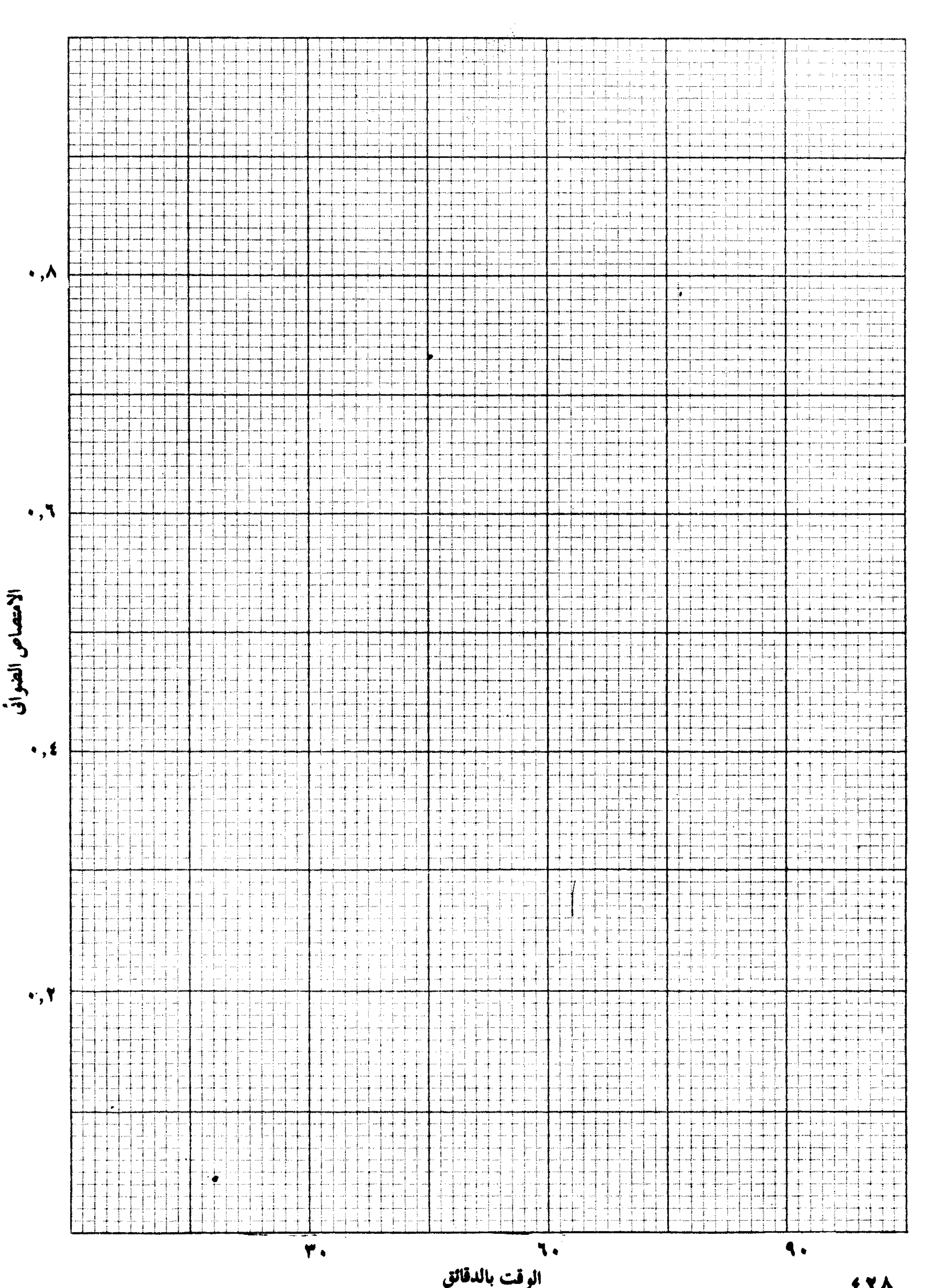
رقـم المعمـل : ______________________

سجل البيانات التالية .

لوغاريتم العدد / مل	العد بالأطباق	الامتصاص الضوئى	الوقت بالدقيقة	
______	______	______	صفر	
______	______	______	١٥	استمر فى القراءات حتى تصل قراءة الامتصاص الضوئى إلى أكثر من ٠,١
______	______	______	٣٠	
______	______	______	٤٥	
______	______	______	٦٠	
______	______	______	٧٥	
______	______	______	٩٠	
______	______	______	١٠٥	

استخدم ورقة الرسم البيانى فى ظهر هذه الصفحة لرسم علاقة الامتصاص الضوئى ولوغاريتم العد بالأطباق مع الوقت .

حساب متوسط طول الجيل لميكروب *Beneckea* أثناء الطور اللوغاريتمى للنمو :


٠,٨
٠,٦
٠,٤
٠,٢
الامتصاص الضوئي
لوغاريتم العدد / مل
٣٠
٦٠
٩٠
الوقت بالدقائق

تقـــريـر ١٨

تأثير الحرارة على النمو

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

سجل النتائج مستخدما المقياس من صفر (عدم النمو) إلى ++++ (نمو غزير جدًا) .

الميكـــــروب	درجـــــة الحــــــرارة				
	٥°م	٢٠°م	٣٧°م	٤٥°م	٥٥°م
Escherichia coli					
Bacillus stearothermophilus					
Pseudomonas fluorescens					
Micrococcus luteus					

الاســـم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

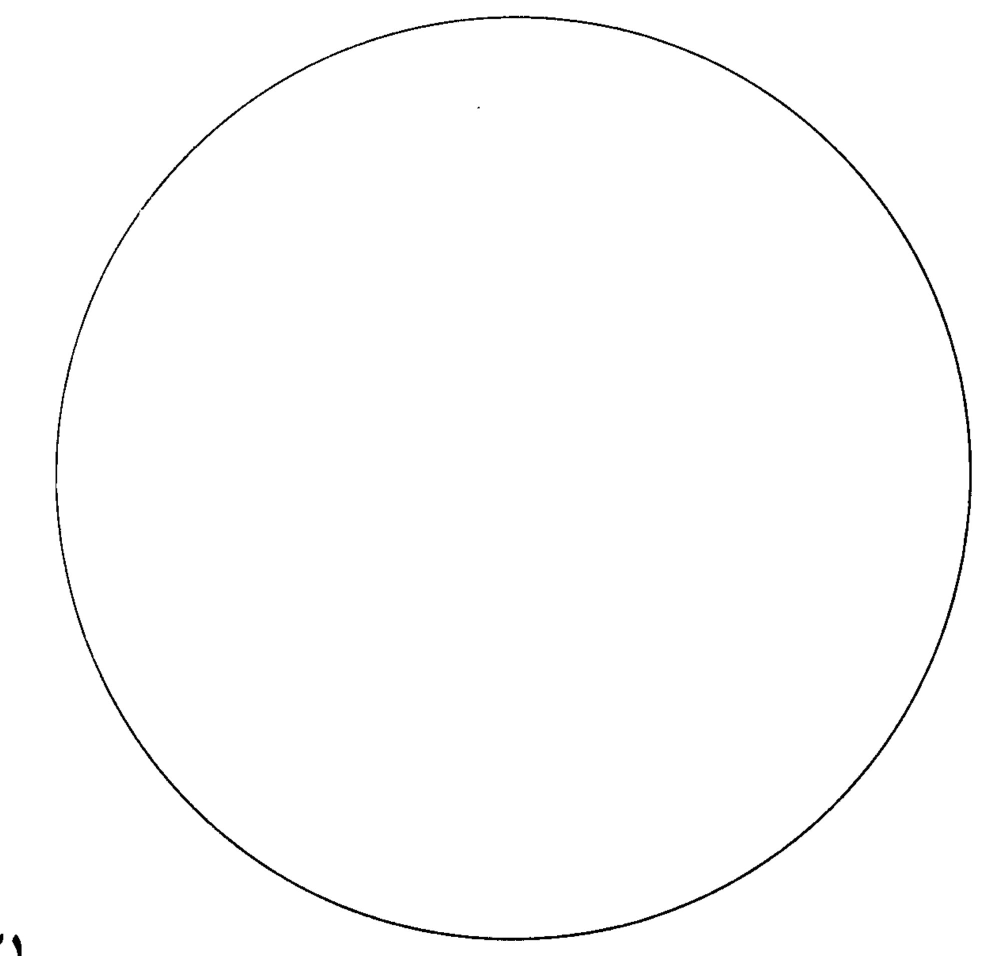
تقــرير ١٩

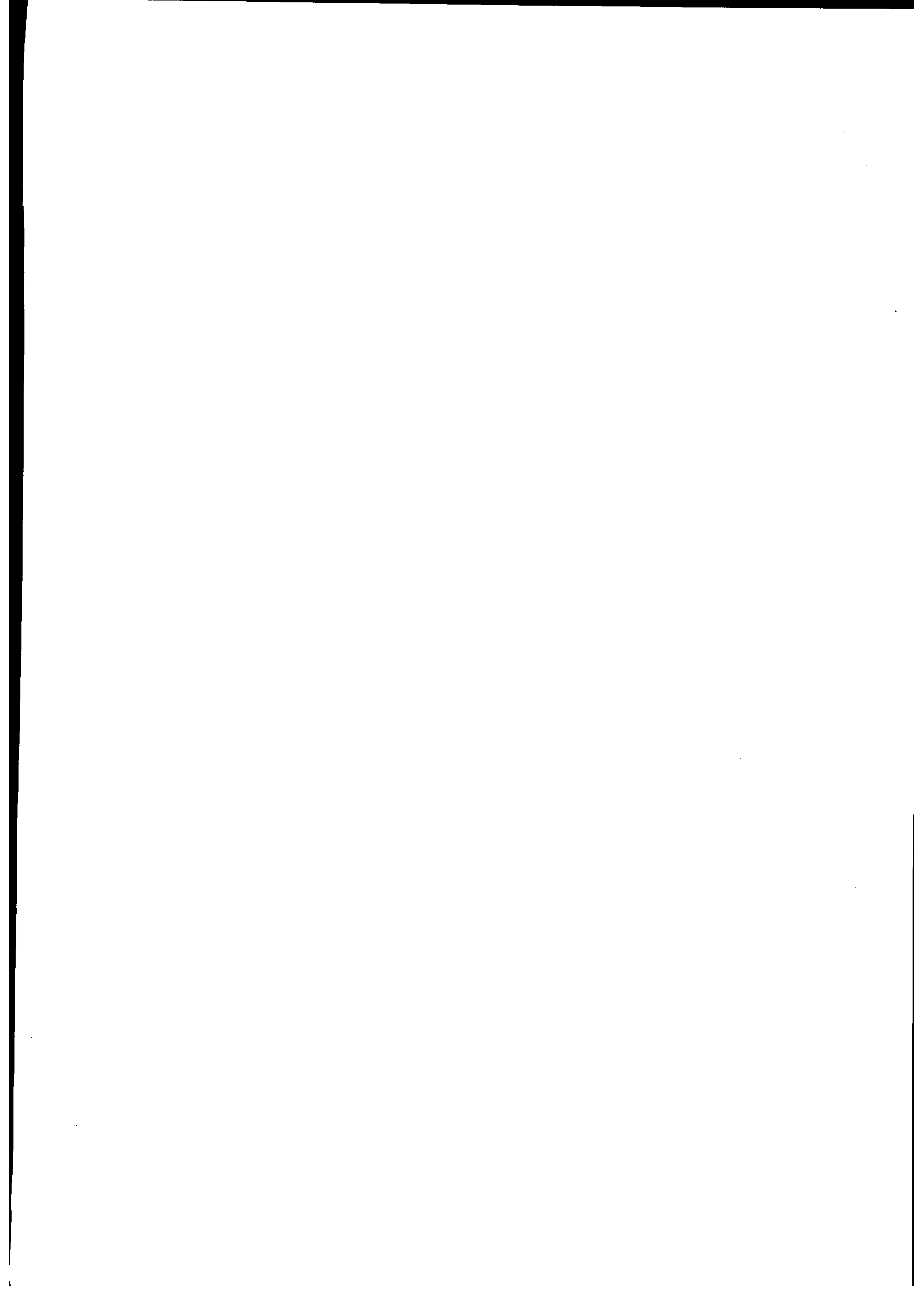
المقاومة الحرارية للخلايا الخضرية وجراثيم كل من البكتيريا والخمائر والفطريات

سجل النتائج مستخدما + عند وجود نمو ، – عند غياب النمو .

نوع الآجار المائــل	أرض	*Saccharomyces cerevisiae*	*Aspergillus niger*	*Escherichia coli*	*Bacillus cereus*
معامل بالحرارة					
غير معامل بالحرارة					

ارسم ما تشاهده بعد صبغ الجراثيم للمزارع النامية بعد المعاملة الحرارية .





تقــرير ٢٠

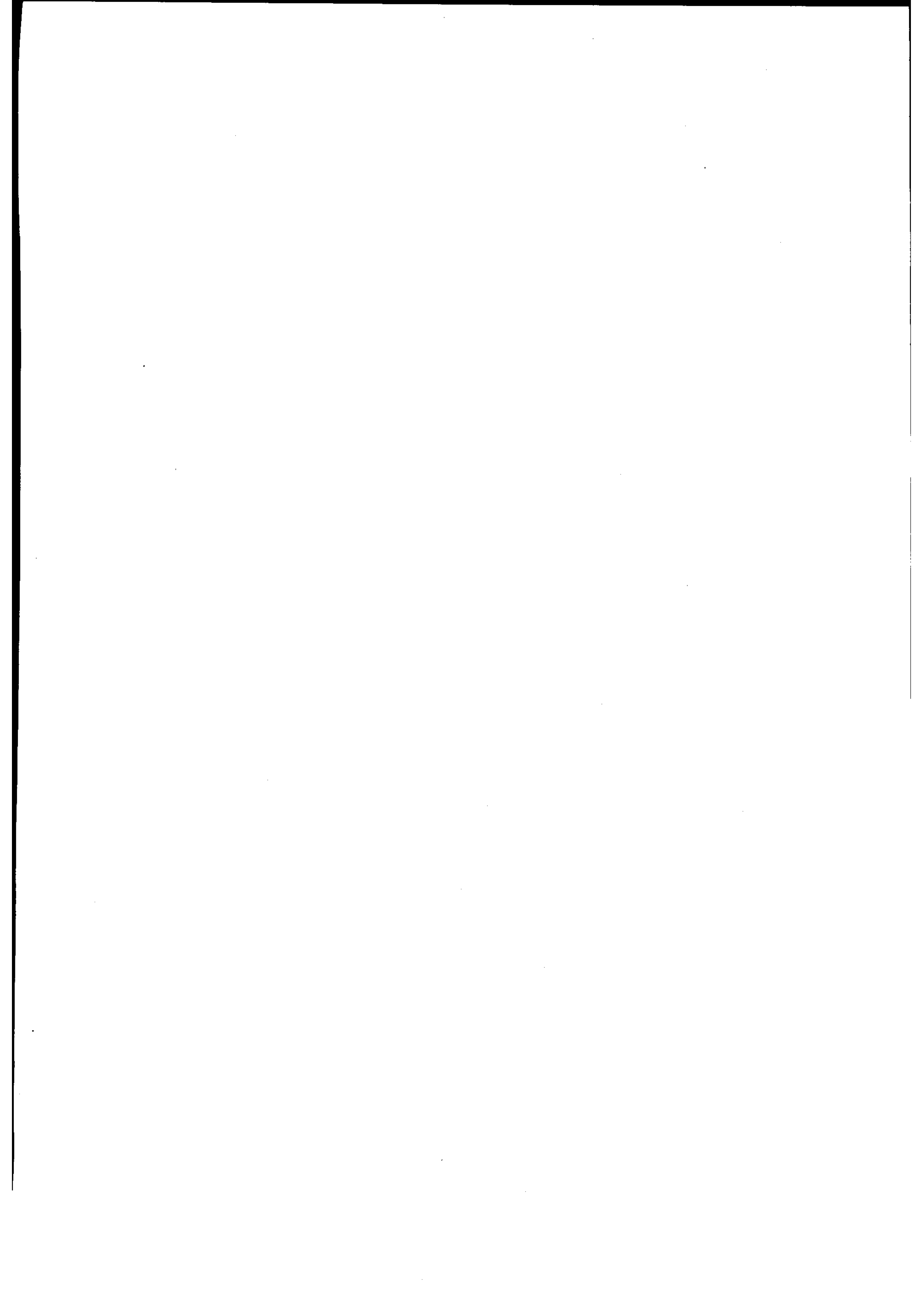
تأثير الضغط الأسموزى على النمو

الاســـم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

سجل النتائج مستخدما المقياس من صفر (عدم نمو) إلى ++++ (نمو غزير جدًا) . ضع فى اعتبارك أن نمو البكتيريا والخمائر يختلف فى مظهره تمامًا عن ذلك الخاص بالفطريات .

الإضـــافات للبيـــئة		هامبرجر خـــام	*Staphylococcus aureus*	*Penicillium chrysogenum*	*Saccharomyces cerevisiae*	*Escherichia Coli*	فواكه جافة
Na Cl	٪٠,٥						
	٪٥,٠						
	٪١٥,٠						
	٪٢٥,٠						
سكروز	٪٠,٥						
	٪١٥,٠						
	٪٣٠,٠						
	٪٦٠,٠						



تقـــرير ٢١

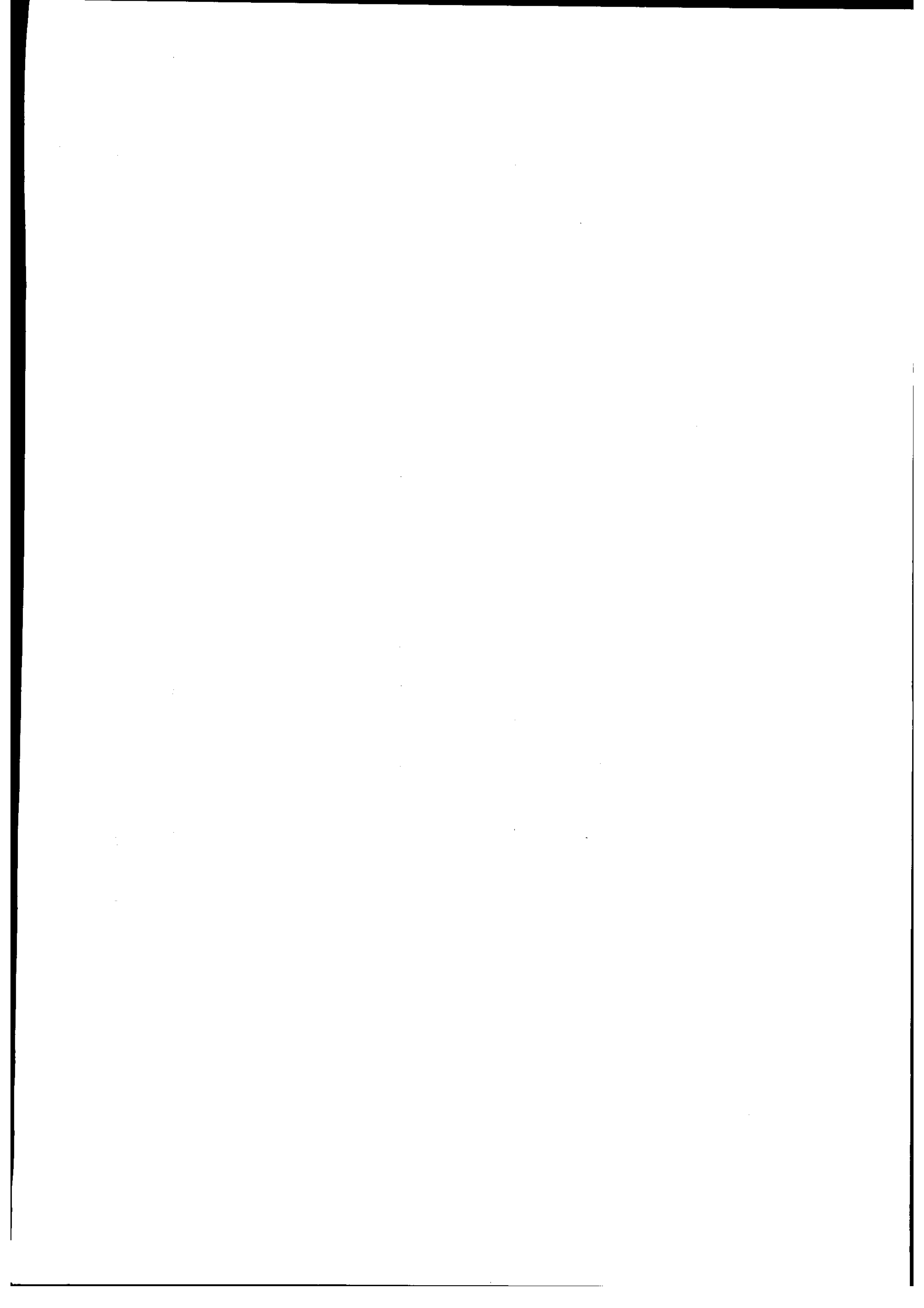
تأثير رقم الأس الأيدروجينى للبيئة على النمو

الاســـم : ____________

رقـم المعمـل : ____________

سجل النتائج باستخدام المقياس من صفر (عدم نمو) إلى ++++ (نمو غزير جدًا) . ضع فى اعتبارك أن نمو البكتيريا والخمائر يختلف فى مظهره تماما عن نمو الفطريات .

الرقم الهيدروجينى (p^H)	*Penicillium chrysogenum*		*Saccharomyces cerevisiae*		*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*	
	يومان	٧ أيام	يومان	٧ أيام	يومان	٧ أيام	يومان	٧ أيام
٣,٠								
٥,٠								
٧,٠								
٩,٠								



تقــريــر ٢٢

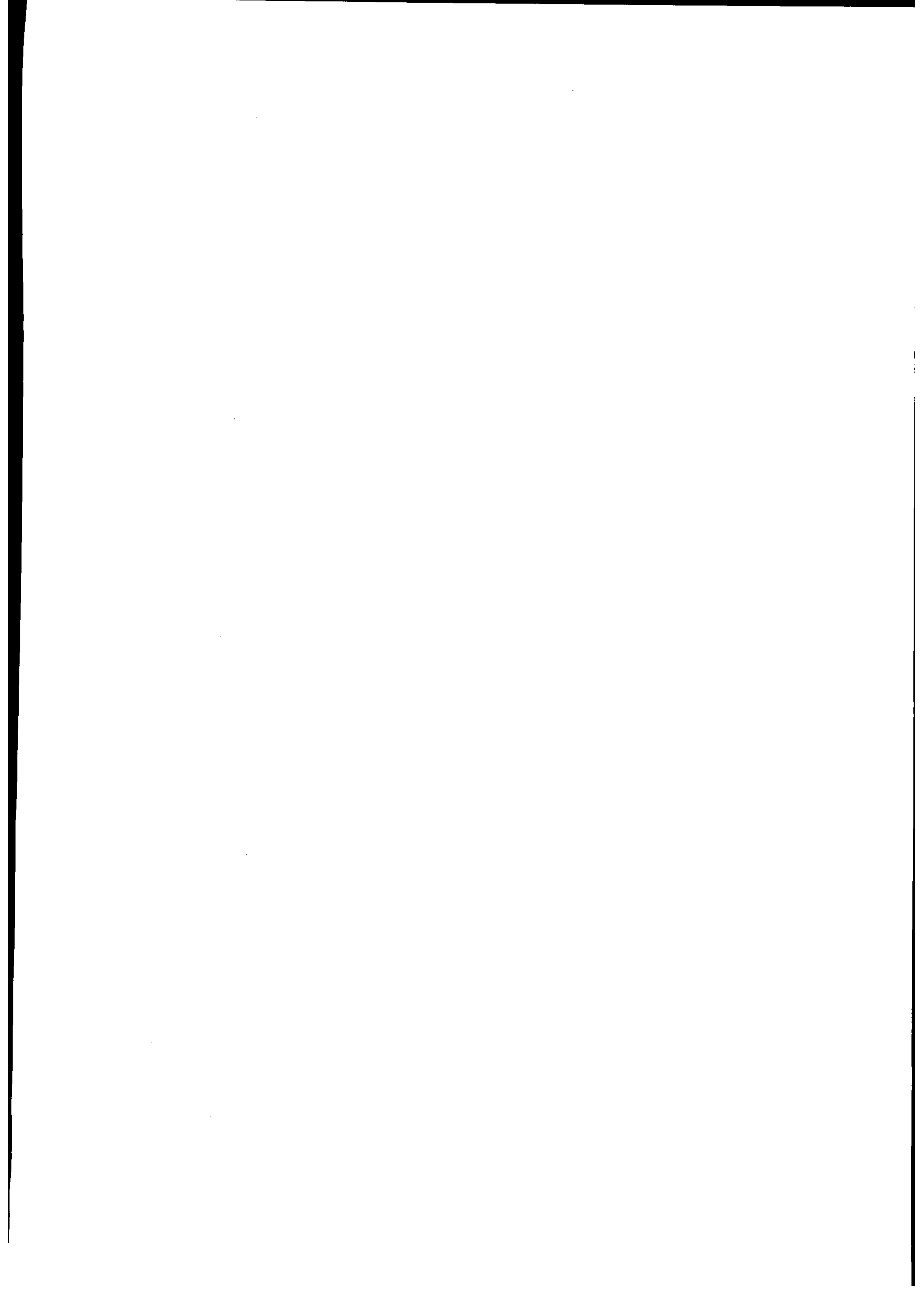
تأثير مصدر الطاقة والمواد المنظمة للحموضة على النمو

الاســـــم : ـــــــــــــــــــ

رقــم المعمــل : ـــــــــــــــــــ

سجل النتائج مستخدما القياس من (عدم نمو) إلى ++++ (نمو غزير جدًا) .

	النمـــو	الرقم الإيدروجينى النهائى
(أ) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة		
(ب) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ١٪ جلوكوز		
(جـ) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ١٪ جلوكوز + ٠,٥٪ K_2HPO_4		
(د) ١٪ تربتون + ١٪ مستخلص خميرة + ٠,١٪ جلوكوز + ٠,٥٪ K_2HPO_4		



تقـــريـر ٢٣

التقدير الكمى باستعمال الميكروبات

الاســــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

سجل قيم الامتصاص الضوئى وكمية Na OH المستخدم لمعادلة حموضة المزرعة لكل تركيز من النياسين .

تركيز النياسين فى الأنبوبة (ug)	الامتصـــاص الضـــوئـى	كمية Na OH ٠,١ ع (مم)
٠,٠		
٠,٠٢٥		
٠,٠٥		
٠,١		
٠,١٥		
٠,٢		
٠,٣		
٠,٥		

استخدم ورق الرسم البيانى فى الصفحة التالية لرسم العلاقة بين كل من الامتصاص الضوئى وكمية *NaOH* (مم) ، وبين تركيز النياسين .

الامتصاص الضوئي

(م) Na OH ع ٠,١

تركيز النياسين

تقـــريـر ٢٤

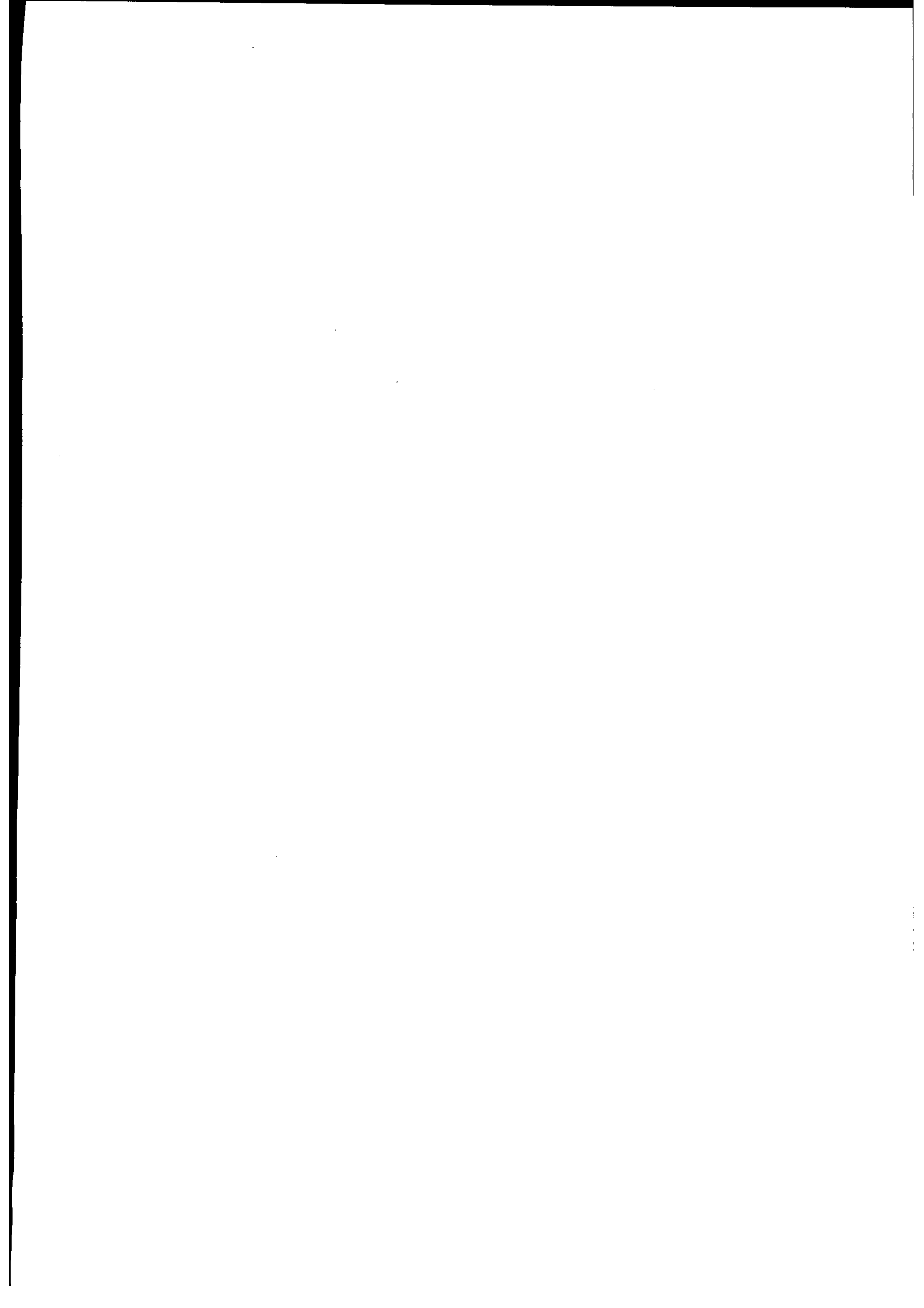
التمثيل الضوئى البكتيرى

الاســـم : ______________

رقــم المعمــل : ______________

سجل النتائج مستخدما المقياس من صفر (لا نمو ، ولا تكوين للصبغات) إلى +++ (نمو مرتفع جدًّا وتكوين مرتفع جدًّا للصبغات) .

الــدورق	النمـــو	إنتــاج الصبغــات
هـوائى مع الضوء		
هوائى فى الظلام		
لاهوائى مع الضوء		
لاهوائى فى الظلام		



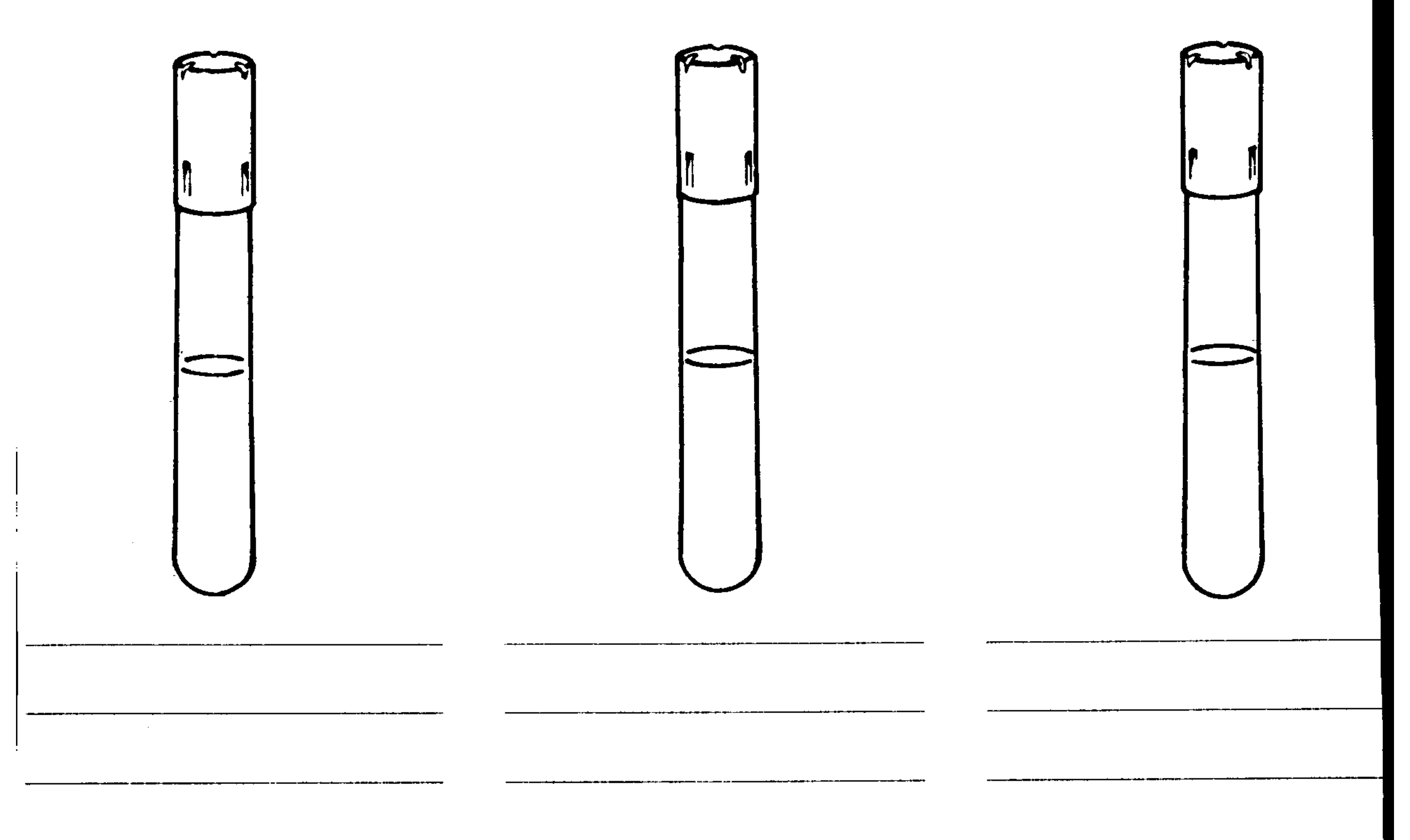
تقـــريـر ٢٥

الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

العلاقة بين الأكسجين الحر والنمو الميكروبى

حدد موقع ومظهر النمو ، واكتب تحت كل رسم اسم الميكروب ، وهل هو اختبارى ، لا هوائى أم هوائى .



تقـــريـر ٢٦

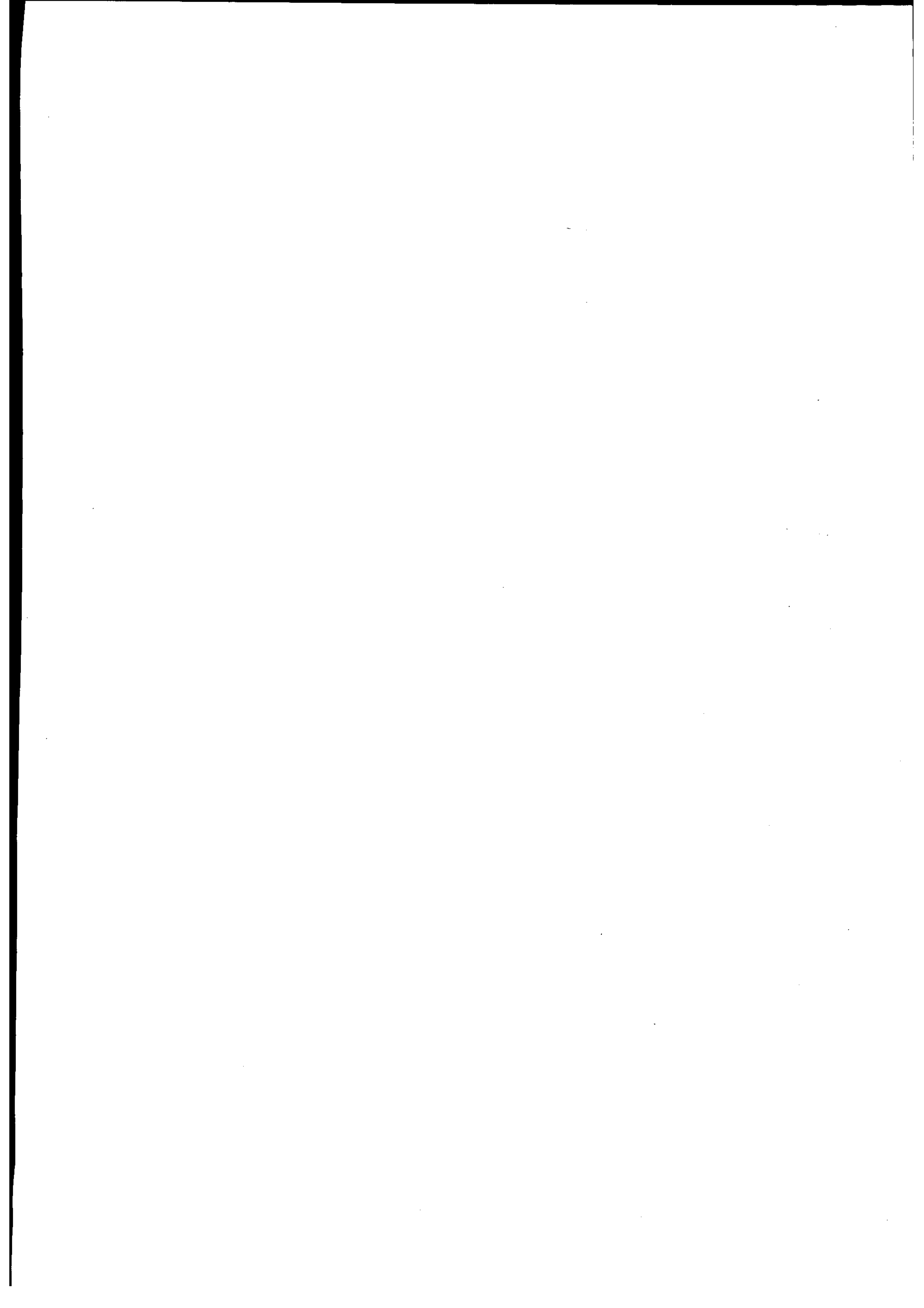
التنمية اللاهوائية للبكتيريا

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

سجل وجود النمو ، أو عدم النمو وأى نشاط آخر مثل إنتاج الغاز .

البيـــئة	*Clostridium perfringens*	*Clostridium sporogenes*
مزرعة الجلوكوز ومستخلص الخميرة المهتزة		
مرق الثيوجليكولات		
مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة مع الفاسبار		
مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة بدون فاسبار		
طبق بترى محضن هوائيا		
طبق بترى محضن لاهوائيا		



تقـــريـر ٢٧

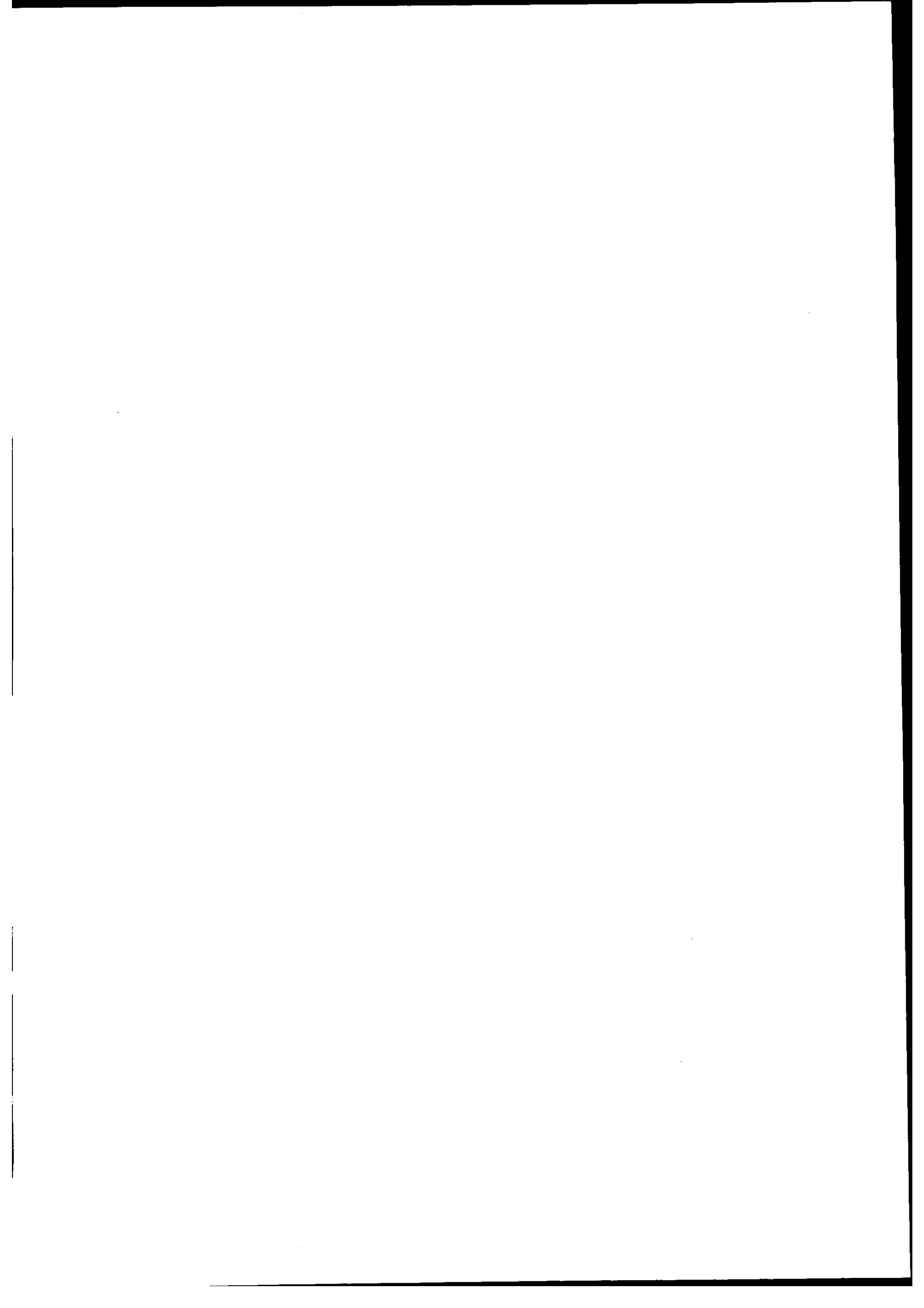
الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

تأثير المطهرات والمواد القاتلة على الميكروبات

سجل قطر منطقة التضاد لكل مركب مدروس .

المادة المطهرة ، أو القاتلة	التركيز	قطر منطقة التضاد (بالملليمتر)	
		Escherichia coli	*Bacillus subtilis*



تقـــريـر ٢٨
التأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية وإعادة التنشيط ضوئيا

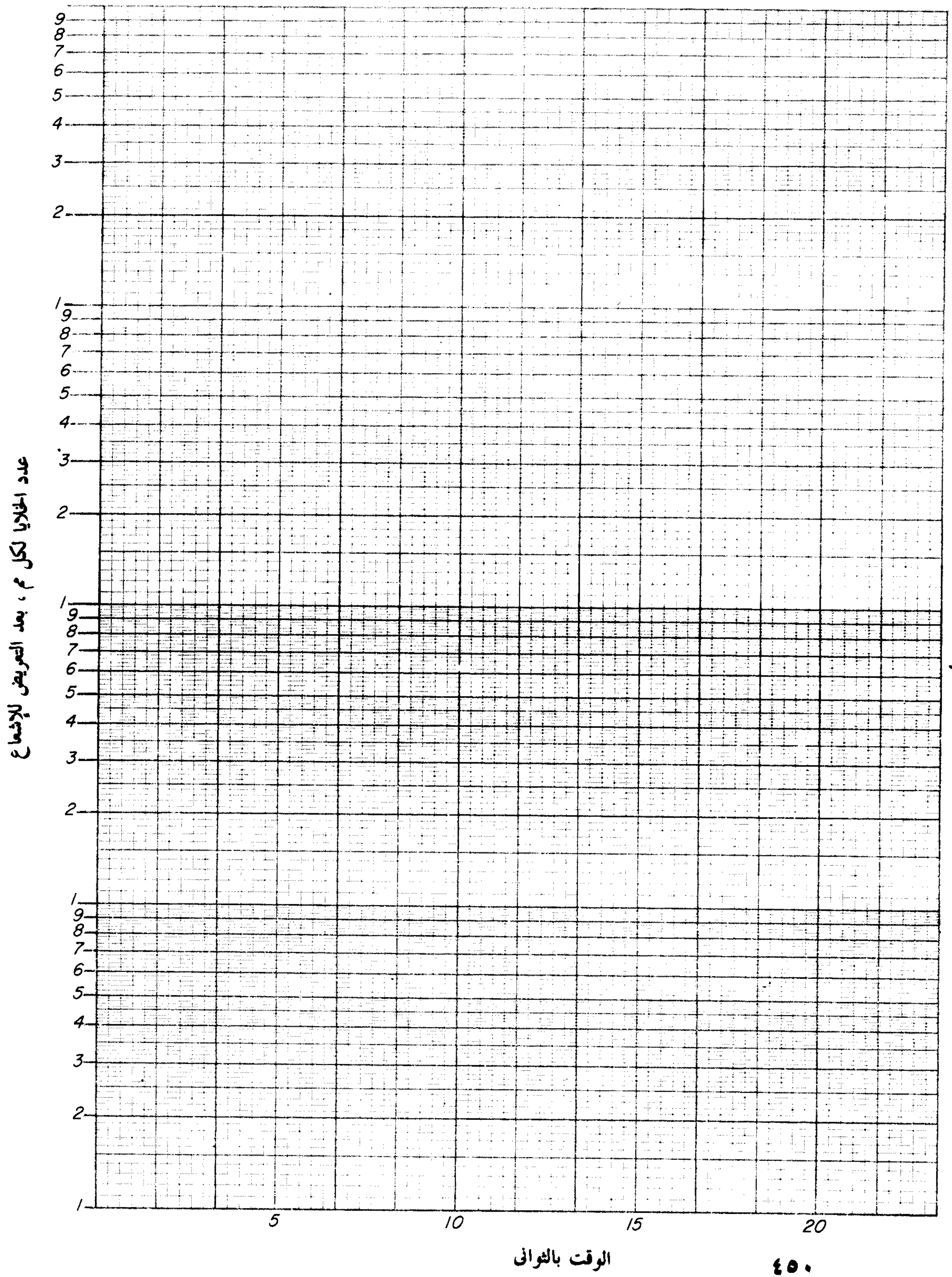
الاســــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

سجل النتائج (العدد فى المزرعة الأصلية ________ × ١٠^-٧^ ميكروب لكل ملليلتر) .

مدة التعريض	الخلايا المعرضة للإشعاع		التنشيط الضوئى للخلايا	
	عد الخلايا الحية × ١٠^٧^	نسبة البقاء	عدد الخلايا الحية × ١٠^٧^	نسبة البقاء
٥ توان				
١٠ ثوان				
١٥ ثانية				

استخدام ورق الرسم البيانى النصف لوغاريتمى فى الصفحة التالية ، لرسم العلاقة بين عدد الخلايا الحية بعد المعاملة بالإشعاع لكل ملليلتر وبين وقت التعريض ، وأيضًا العلاقة بين الخلايا الحية بعد التنشيط الضوئى لكل ملليلتر وبين الوقت .



عدد الخلايا الحية (لكل م) بعد التنشيط الضوئي

الوقت بالثوانى

تقـــرير ٢٩

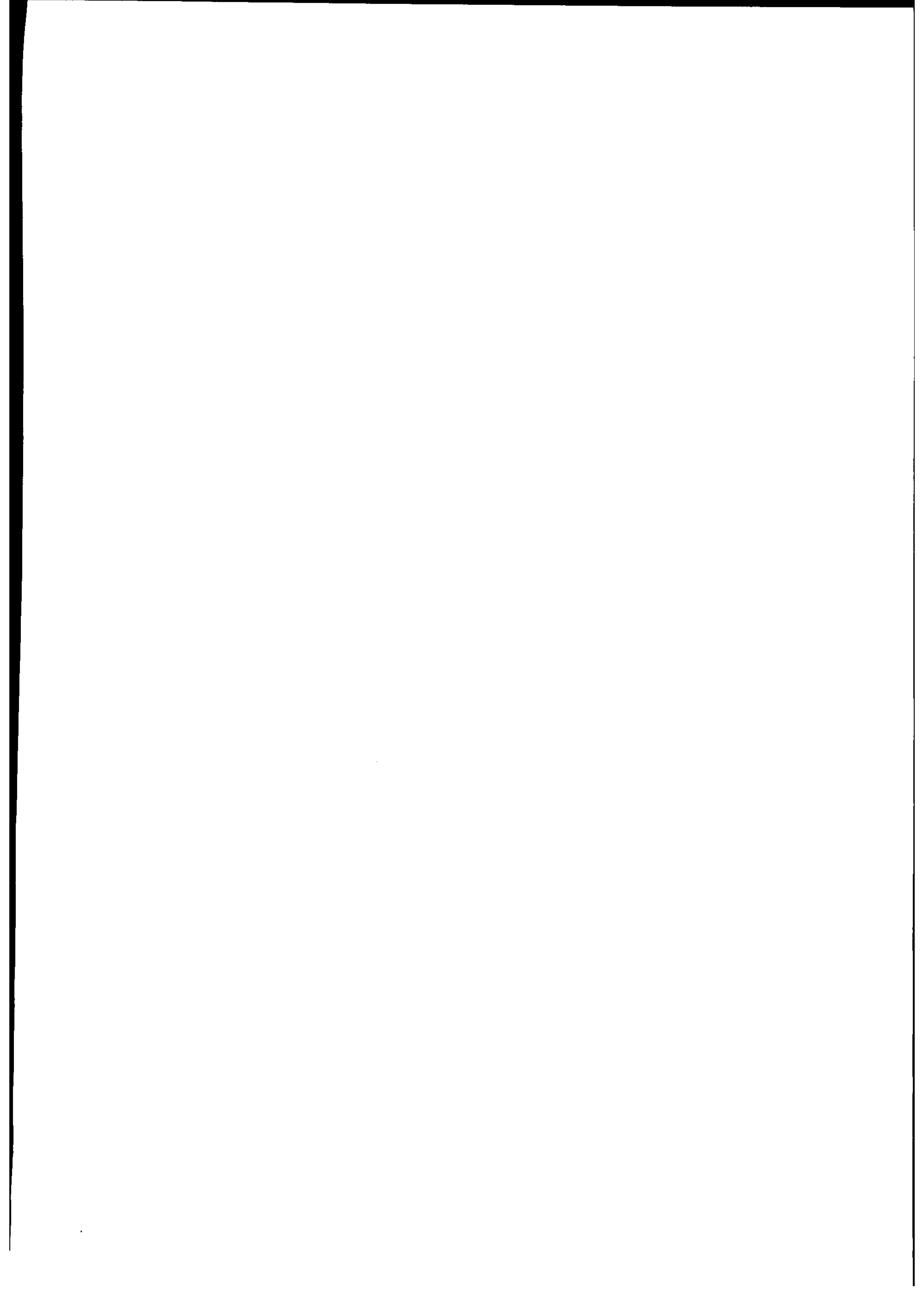
الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

مثبطات التمثيل : تثبيط النمو بالسلفانيلاميد

سجل النتائج مستخدمًا المقياس من صفر (عدم النمو) إلى ++++ (نمو عال جدًا) .

البيـــــئة	النمـــــو
بيئة الكفاف	
بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد	
بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد + ٢ × ١٠$^{-٨}$ مولر حامض بارا أمينوبنزويك	
بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد + ٢ × ١٠$^{-٧}$ مولر حامض بارا أمينوبنزويك	
بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد + ٢ × ١٠$^{-٥}$ مولر حامض فوليك	
بيئة الكفاف + ٠,٠٢ مولر سلفانيلاميد + مخلوط مركبات التمثيل الوسطية	



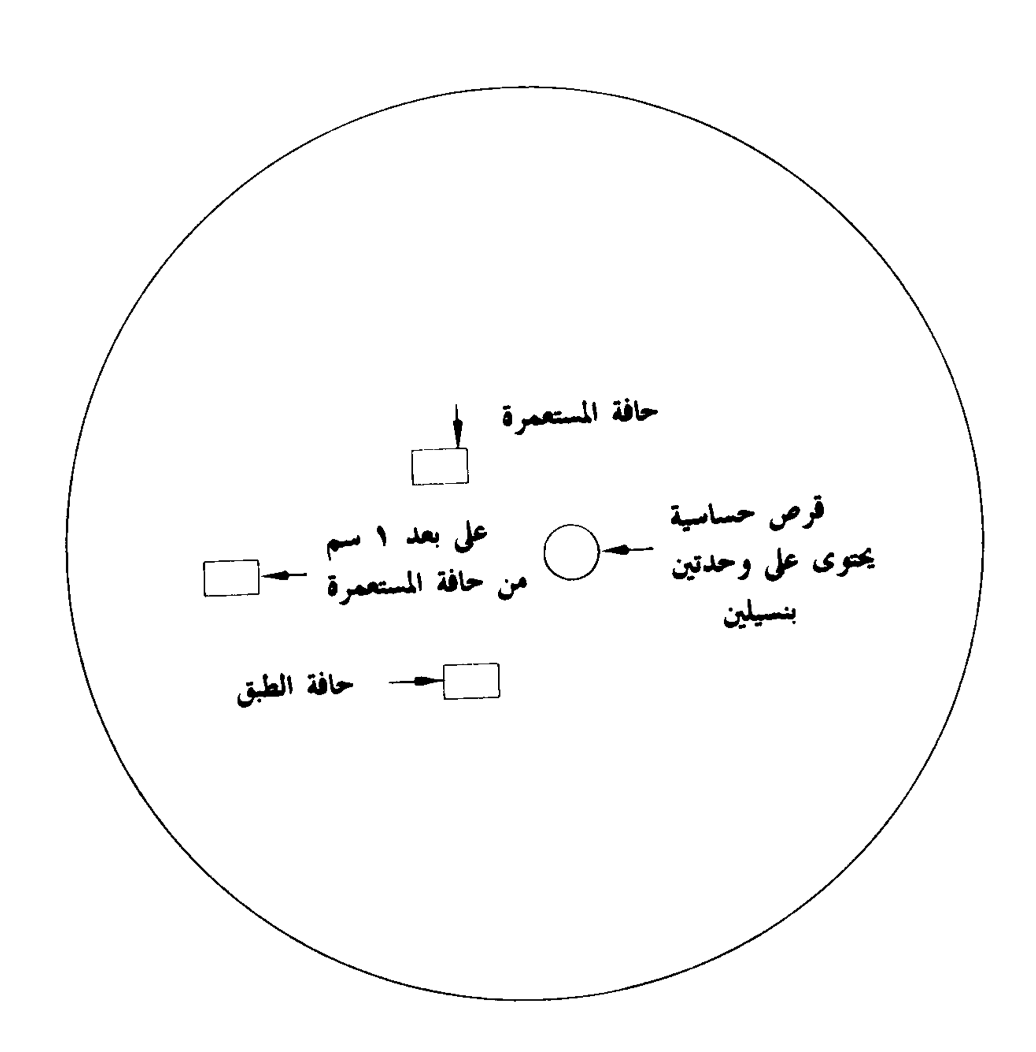
تقـــرير ٣٠

الاســـــم : ________________

رقـم المعمــل : ________________

التضاد الجزء الأول :
التأثر بالمضادات الحيوية

وضح ، برسم مناطق التضاد بالحجم المناسب فى الدائرة التالية ، التأثير النسبى لقطع الآجار المأخوذة من أطباق الـ *Penicillium* فى تثبيط نمو ميكروب *Staphylococcus aureus* .



الاســـم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

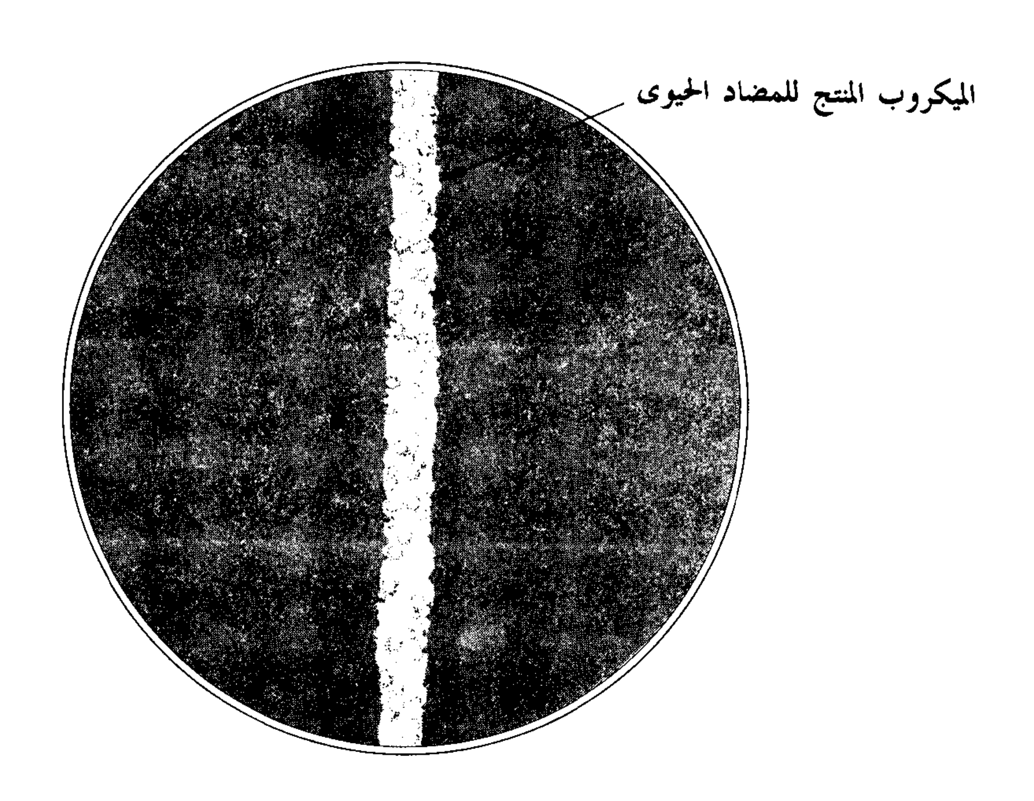
الجزء الثانى :

عزل ميكروب منتج للمضادات الحيوية

سجل النتائج :

المـــزرعـة الميكـــروبيـة	قطر التضاد التى يكونها الميكروب المنتج للمضاد الحيوى
الجنـس النـوع	
١ ________ ________	________ مم
٢ ________ ________	________ مم
٣ ________ ________	________ مم
٤ ________ ________	________ مم

ارسم ما تشاهده

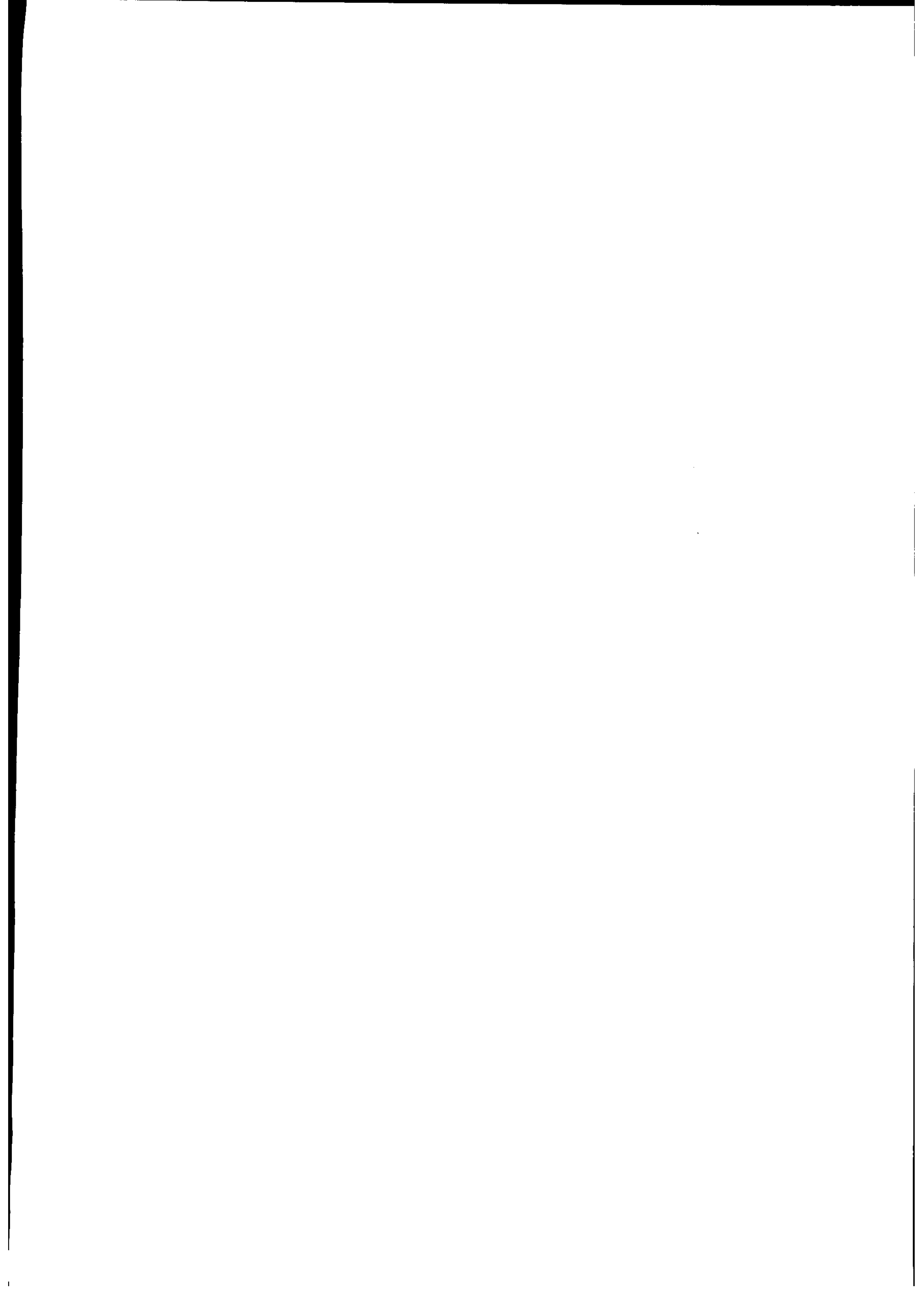


تقــريـر ٣١
التكافل

الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

ارسم تركيب خلايا الطحلب والفطر والأشن التى فحصتها .



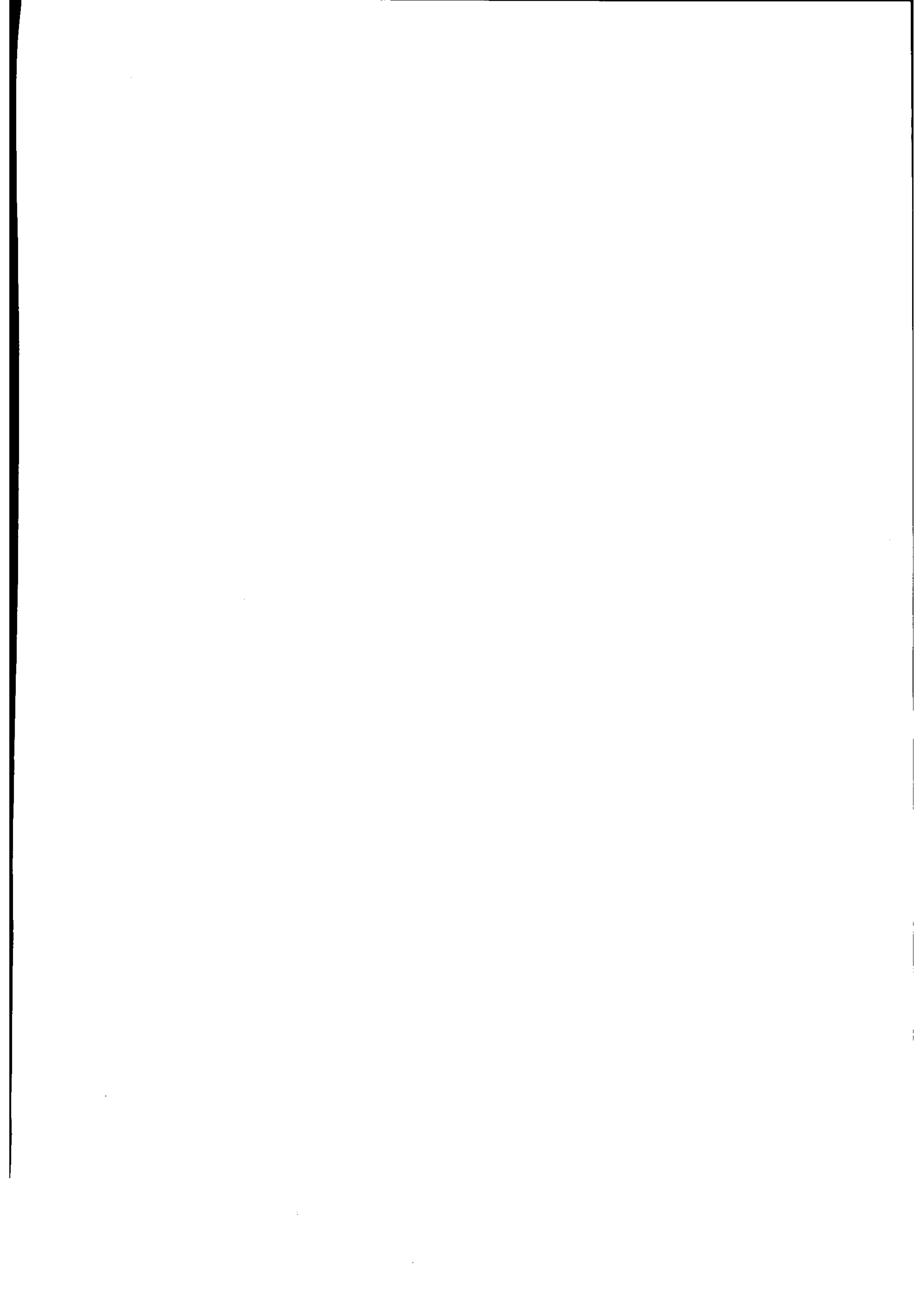
تقـــرير ٣٢

عمود فينوجرادسكى

الاســـــم : ____________________

رقـم المعمـل : ____________________

سجل نتائج ملاحظاتك على العمود لعدة أسابيع ، موضحا تغيرات اللون وتكوين الغاز . بين الأشكال المورفولوجية للخلايا التى تشاهدها ميكروسكوبيا فى العينات المتتالية . استنتج من الفحص المجموعات والأجناس الميكروبية التى تظهر فى العمود . اعتمد على *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* الطبعة الثامنة للحصول على معلومات إضافية .



تقـــرير ٣٣

الاســـم : ـــــــــــــــــــــــــ

رقـم المعمـل : ـــــــــــــــــــــــــ

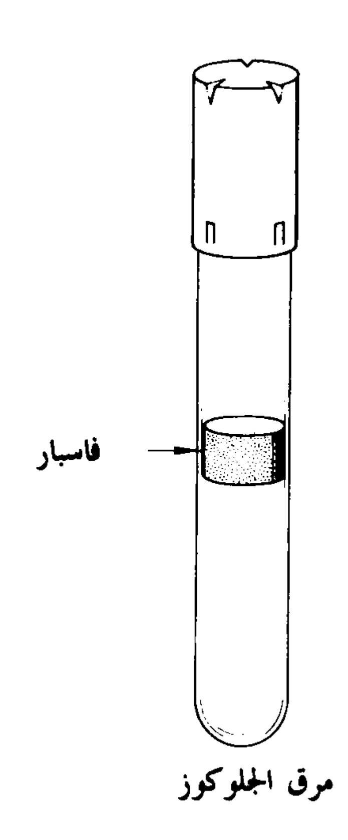
تخمر الكربوهيدرات

الجزء الأول

سجل ح فى حالة إنتاج الحامض
غ فى حالة إنتاج الغاز

اللقـــاح	جلـــوكوز	سكـــروز	لاكتـــوز
Escherchia coli			
Streptococcus faecalis			
Proteus vulgaris			
مقـــارنة			

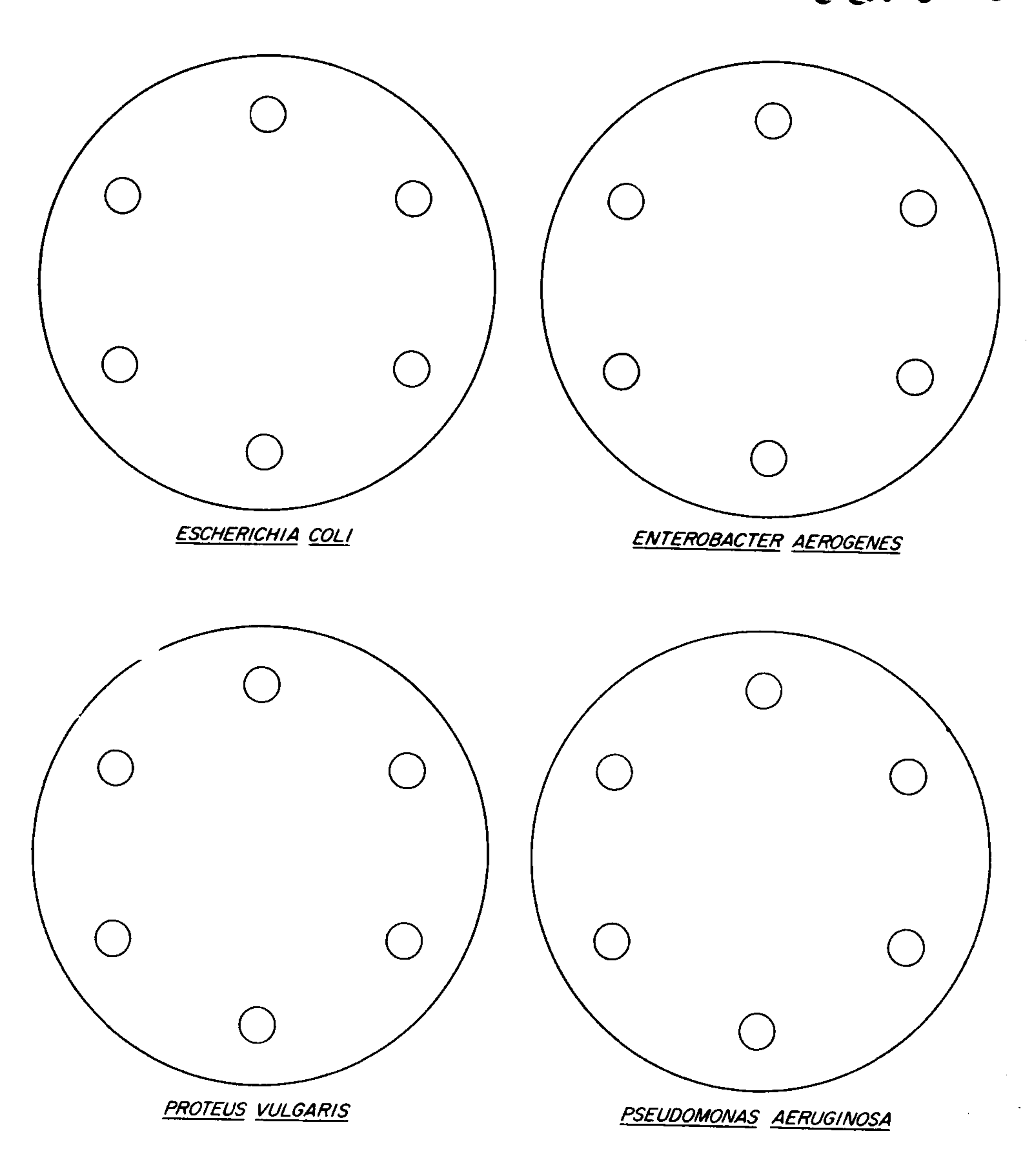
سجل ملاحظاتك عن مظهر مزرعة مرق الجلوكوز المغطى بالفاسبار باستكمال الرسم .



مرق الجلوكوز

الجزء الثانى

رقم أقراص الكربوهيدرات . ووضح أيًا منها قد تخمر بالمزارع الأربعة . وهل تحدث أكسدة للنواتج الحامضية فى أى من المزارع مع استمرار التحضين .



الجز الثالث :

سجل التفاعلات ، وصف شكل نمو *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* على آجار الجلوكوز .

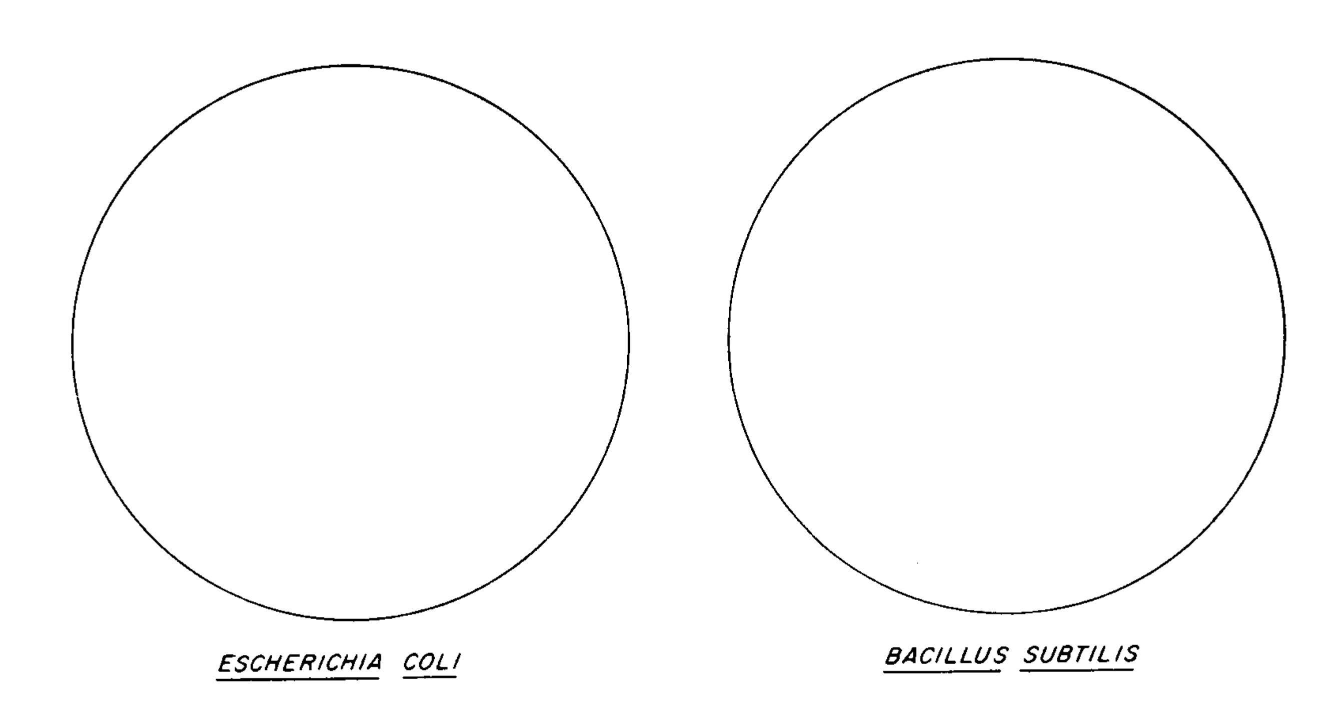
تقـــرير ٣٤

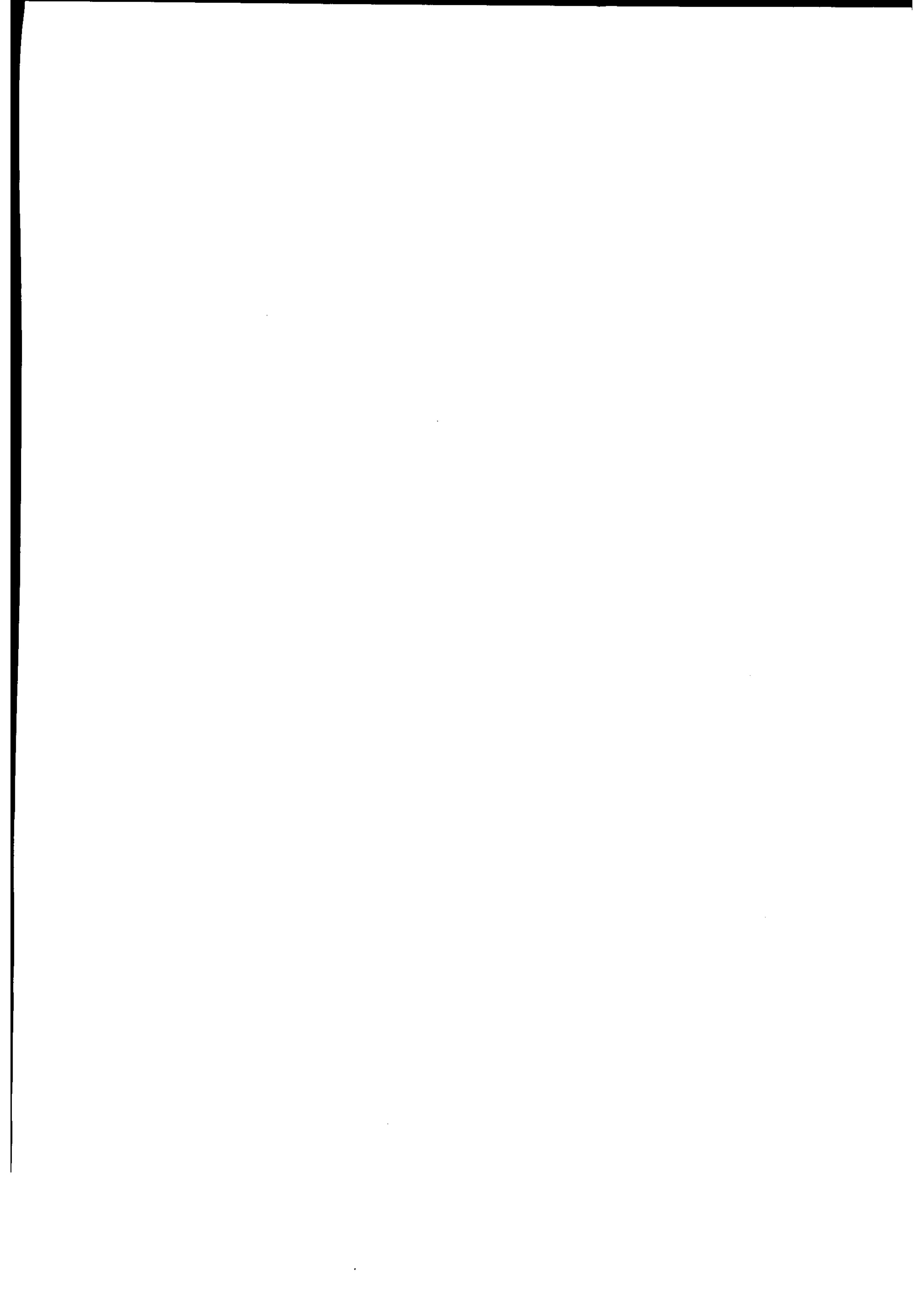
التحلل المائى للنشا

الاســــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

وضح مساحة النمو ومساحة منطقة تحلل النشا .





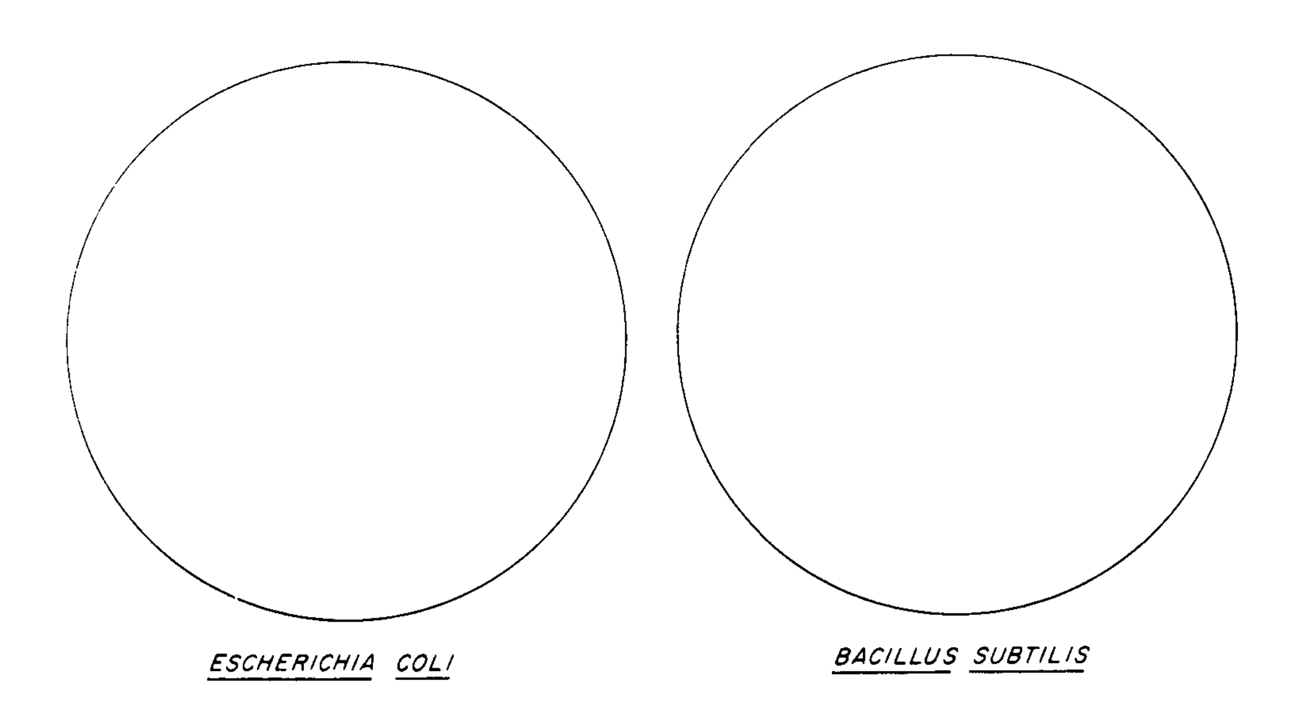
تقـــريـر ٣٥

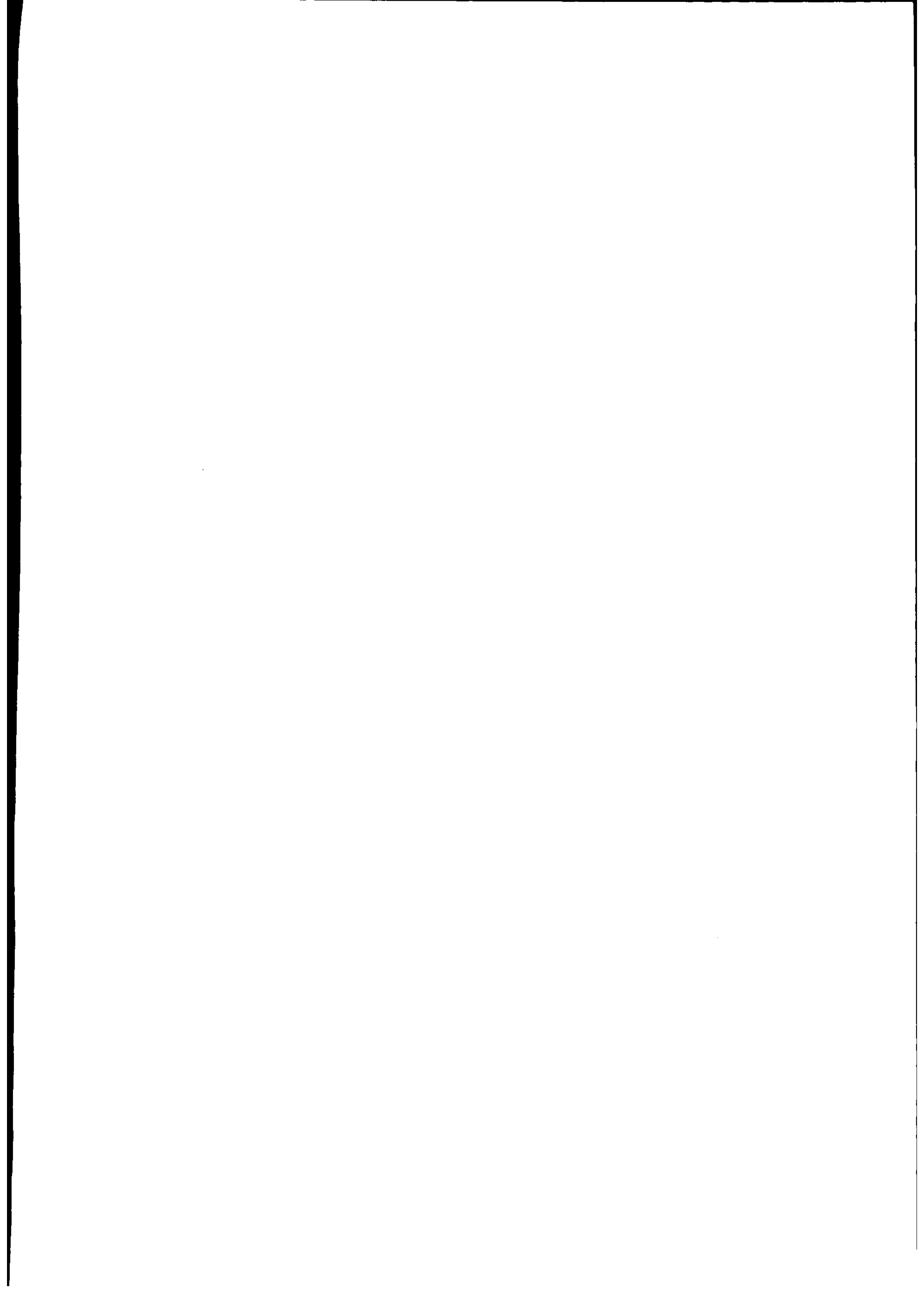
التحلل المائى للكازين

الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

بين المستعمرات التى تحلل الكازين ومنطقة التحلل .





تقــريـر ٣٦

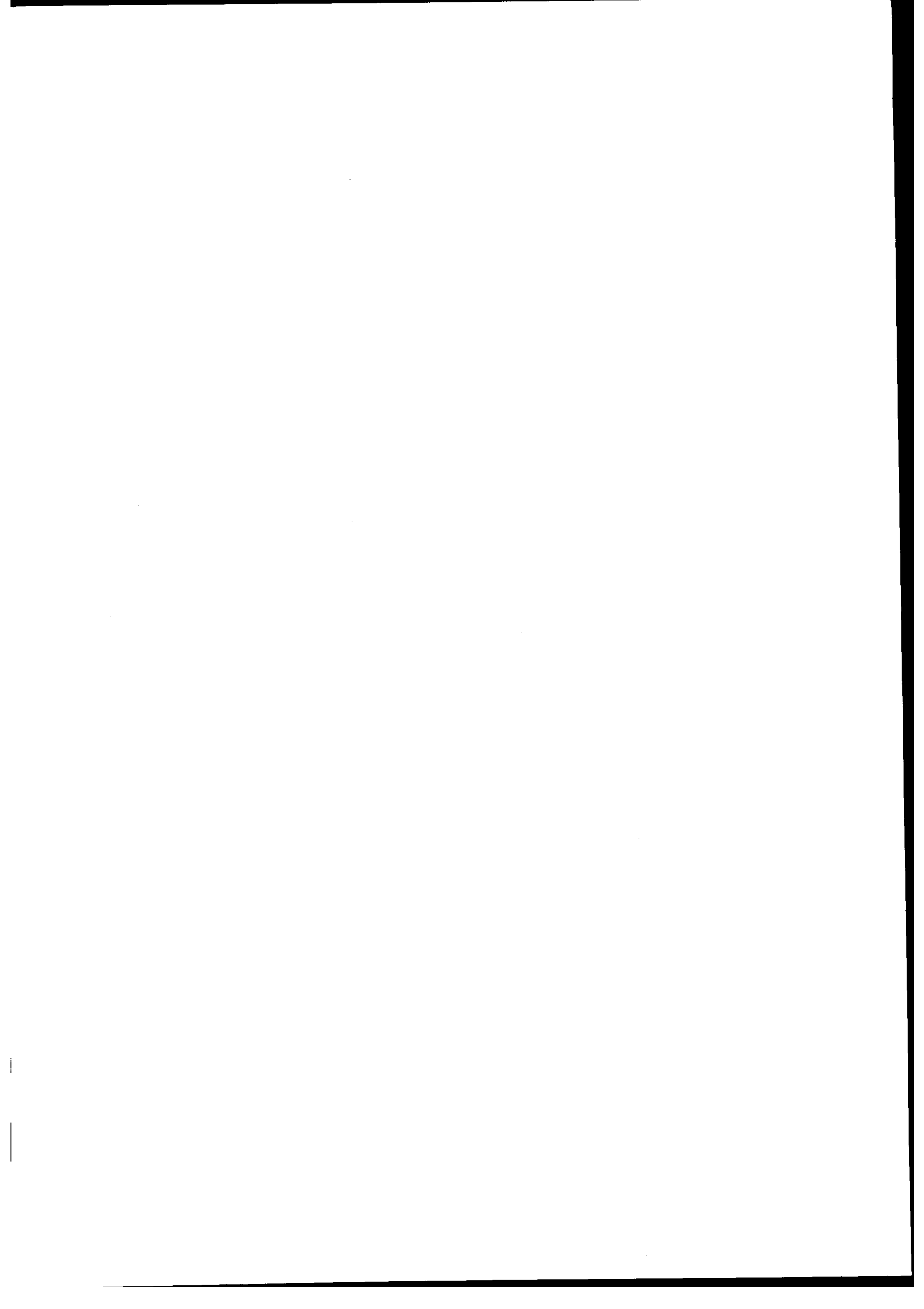
التحلل المائى للجيلاتين

الاســـــم : ______________________

رقــم المعمــل : ______________________

سجل نتيجة تحلل الجيلاتين : + تحلل (تبقى البيئة سائلة بعد وضعها فى حمام ثلج) .
ـــ عدم تحلل (تصبح البيئة صلبة بعد وضعها فى حمام ثلج) .

الميكـــــــروب	تحـلل الجيــلاتين
Escherichia coli	
Bacillus subtilis	
Streptococcus faecalis	
Proteus vulgaris	



تقـــرير ٣٧

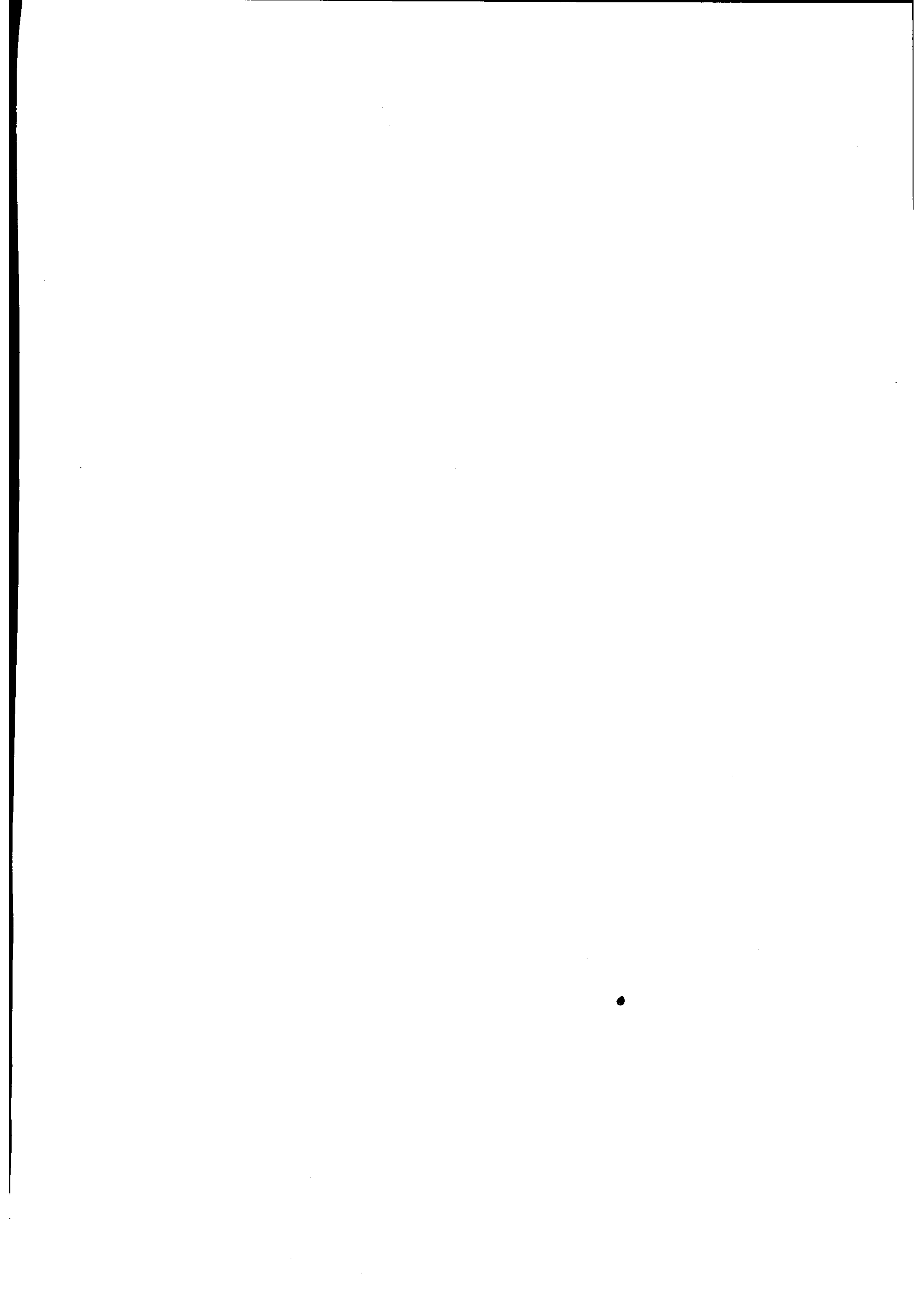
الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

استخدام الميكروبات للأحماض الأمينية

سجل نتائج المزارع التالية :

البيـــئة	*Escherichia coli*	*Enterobacter aerogenes*	*Proteus Vulgaris*
نزع مجاميع الكربوكسيل من الليسين			
نزع مجاميع الكربوكسيل من الارنيثين			
نزع مجاميع الكربوكسيل من الفينيل الانين			
إنتاج الإندول			
إنتاج كبريتور الهيدروجين			



تقـــريـر ٣٨

التحلل المائى لليبيدات

الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

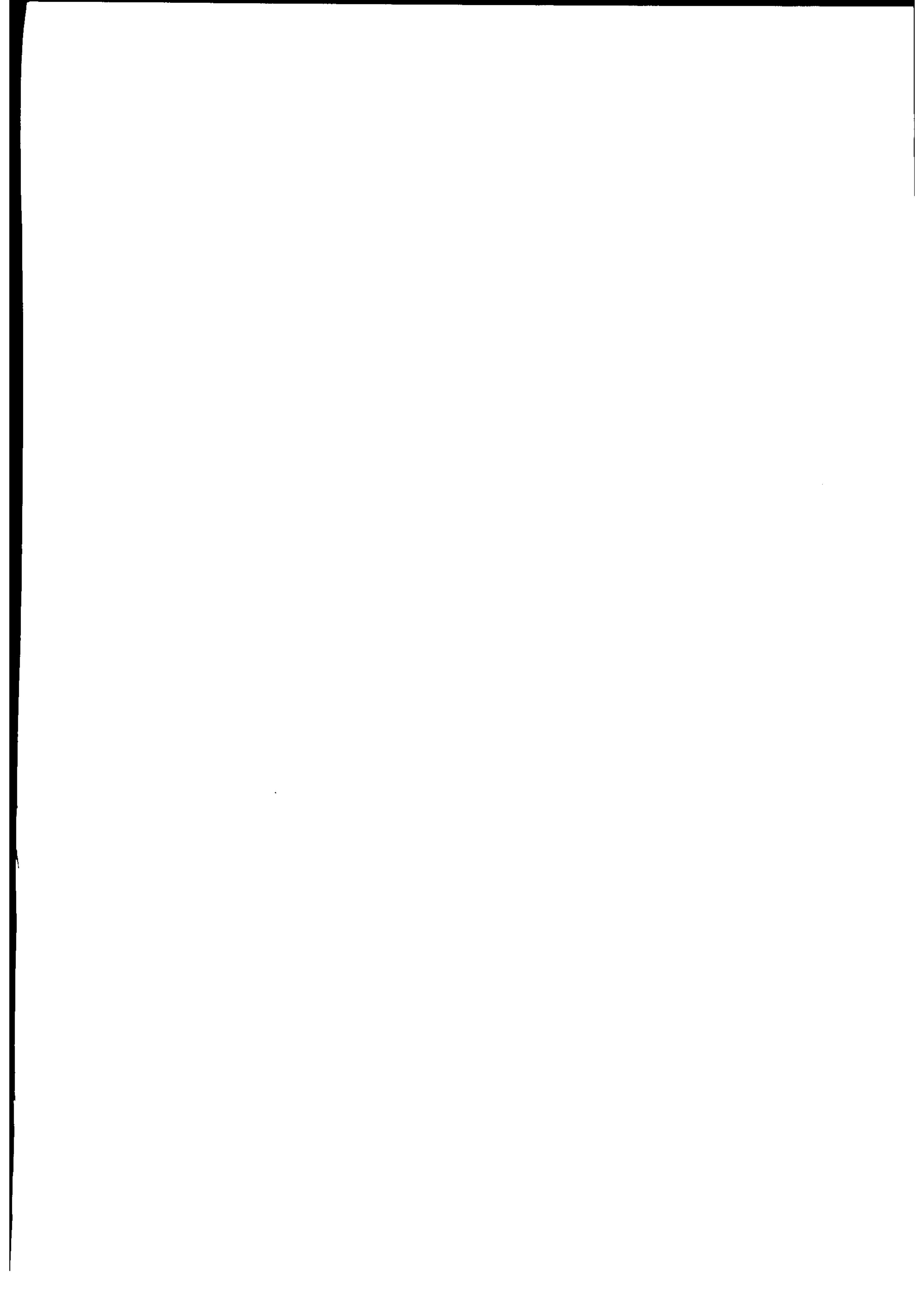
وضح أيًا من المزارع الآتية تحلل الفوسفوليدات .

Pseudomonas aeruginosa ______________________

Staphylococcus aureus ______________________

Bacillus cereus ______________________

Escherichia coli ______________________



تقـــريـر ٣٩
نشاط إنزيم الكاتاليز

الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

الجزء الأول :

وضح أيًا من المزارع الآتية يُنتج الكاتاليز .

	مرق مستخلص الخميرة	آجار مستخلص الخميرة
Streptococcus faecalis	______________	______________
Staphylococcus aureus	______________	______________

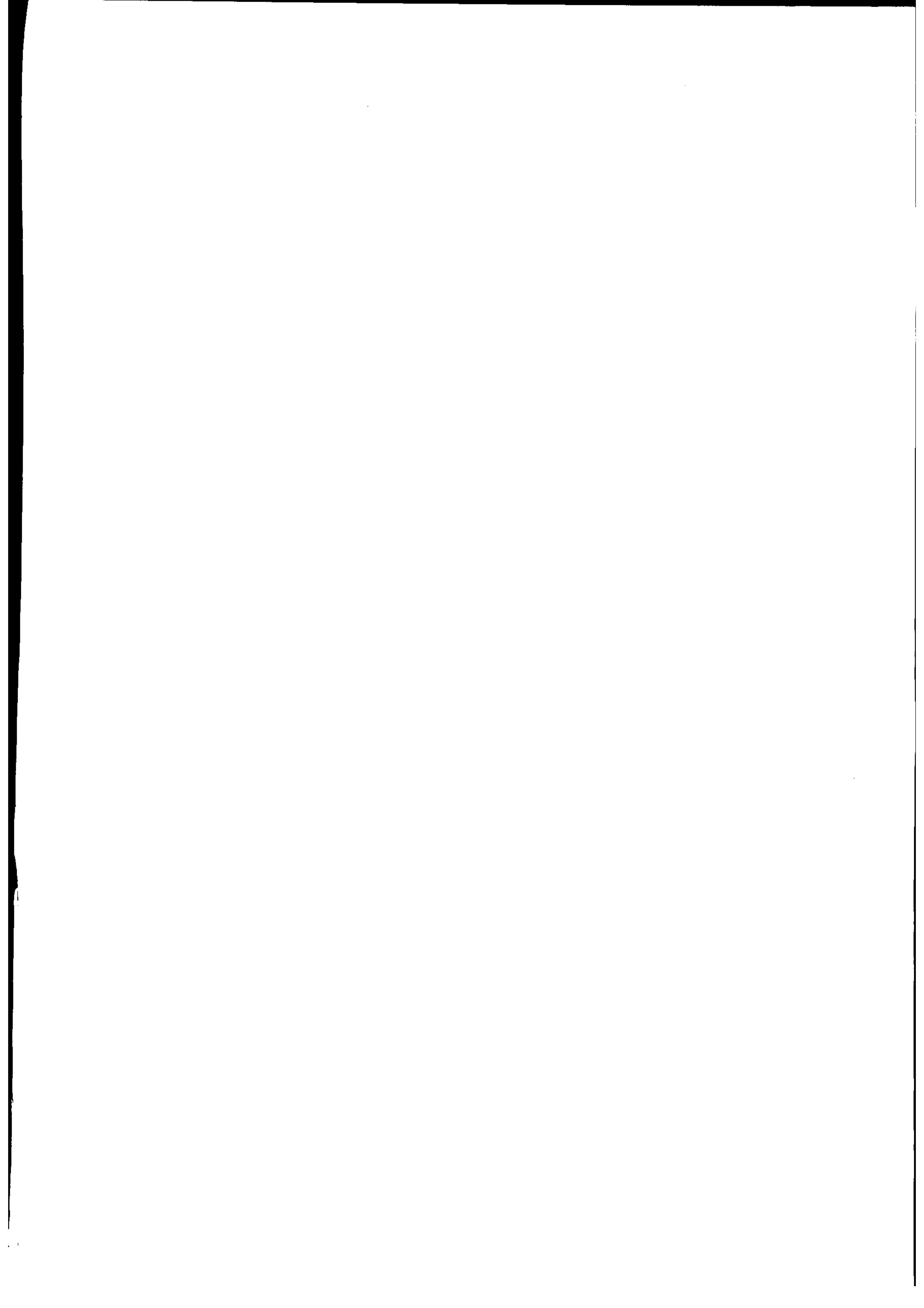
الجزء الثانى :

أيًا من المزارع الآتية يُنتج الكاتاليز .

مزرعة *Streptococcus faecalis* على آجار الدم ______________________

مزرعة *Staphylococcus aureus* على آجار الدم ______________________

بيئة آجار الدم ______________________



تقـــرير ٤٠
اختبار الأكسيديز

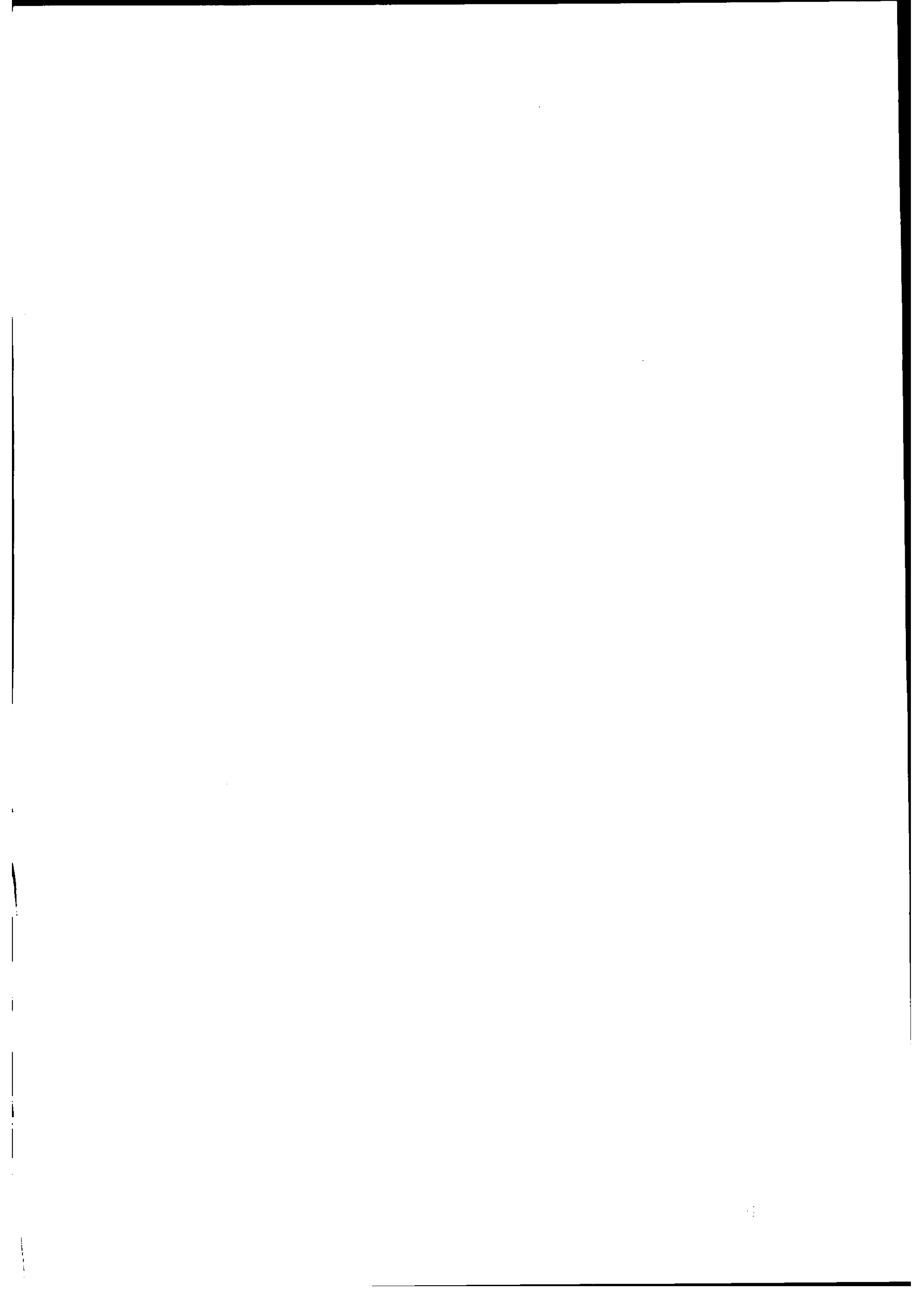
الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

وضح أيًّا من المزارع التالية تعطى نتيجة إيجابية ، وأيها تعطى نتيجة سلبية بالنسبة لإنزيم الأكسيديز .

Pseudomonas fluorescens ______________________

Staphylococcus aureus ______________________



تقـــريـر ٤١

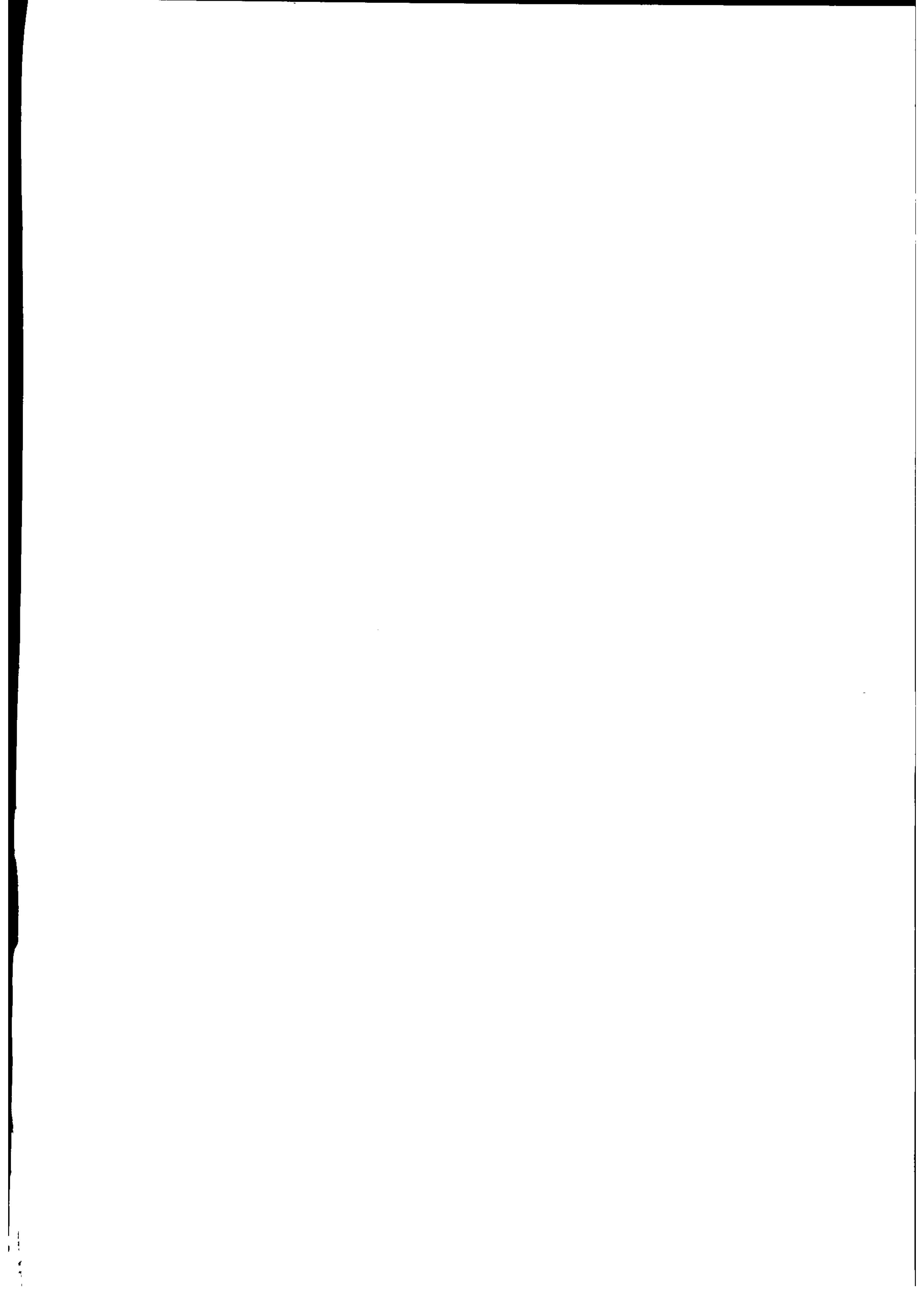
تأثير البكتيريا على اللبن

الاســـــم : ____________________

رقـم المعمـل : ____________________

سجل نتائجك موضحًا إنتاج الحامض ، إنتاج الخثرة بإنزيم الرينين ، واختزال لون عباد الشمس ، وتحلل البروتين .

المـــزرعـة	إنتاج حامض	تخثر	اختزال	تحلل بروتين
Escherichia coli				
Streptococcus lactis				
Bacillus subtilis				
Proteus vulgaris				



تقــريـر ٤٢

الاســـــم : ________________

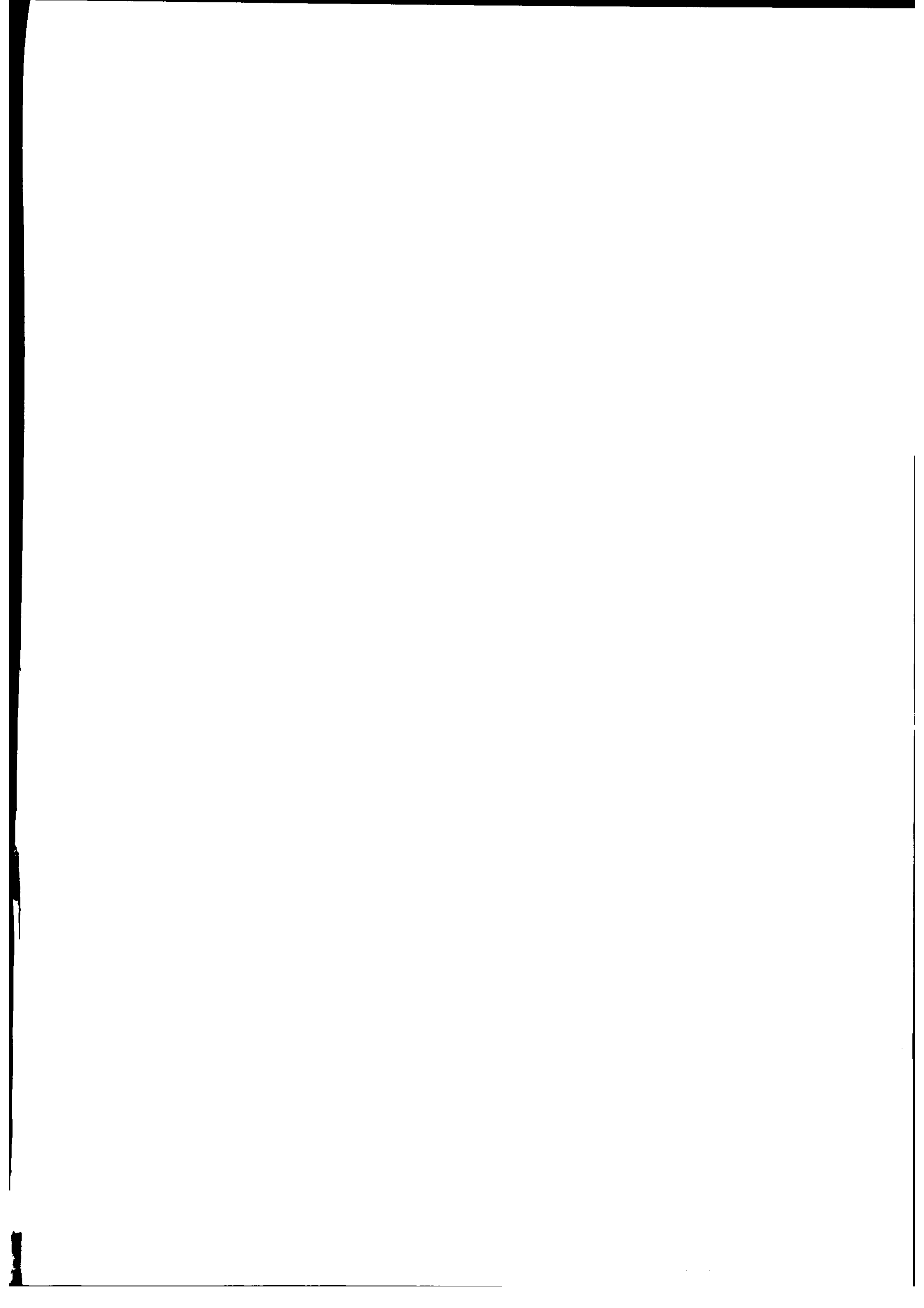
الأطباق التفريقية

رقــم المعمــل : ________________

بافتراض ان عقدة إبرة التلقيح المستخدمة تحمل التخفيفات تحمل ٠,٠١ مل من العينة ، وأن التخفيفات عملت فى أنابيب تحتوى على آجار عميق .

ــ ما هو عدد البكتيريا المحللة لسكر اللاكتوز لكل ملليلتر من اللبن الحليب ؟

ــ ما هو عدد البكتيريا المحللة للكازين لكل ملليلتر من معلق التربة ؟



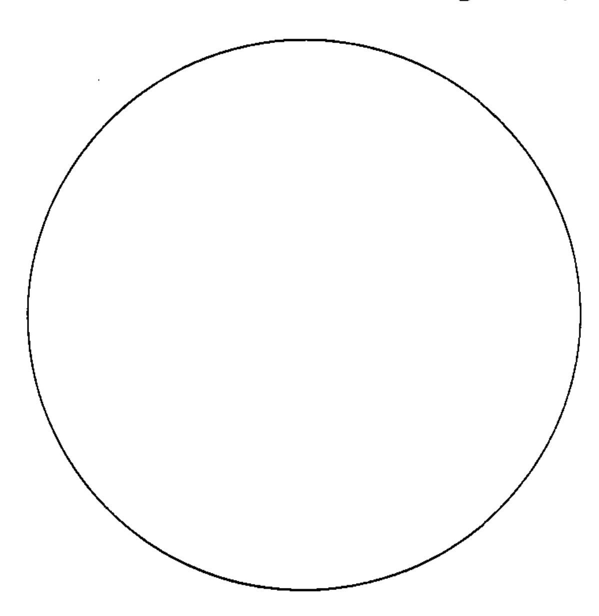
تقــريـر ٤٣

الأطباق الانتقائية

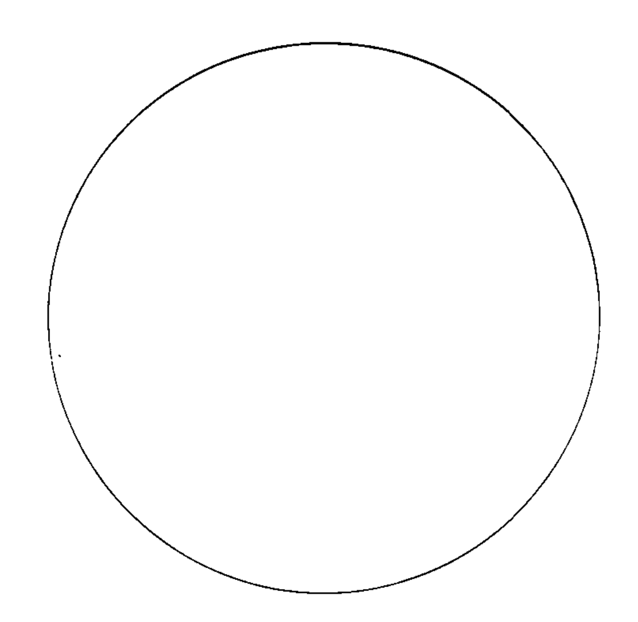
الاســـــم : ____________________

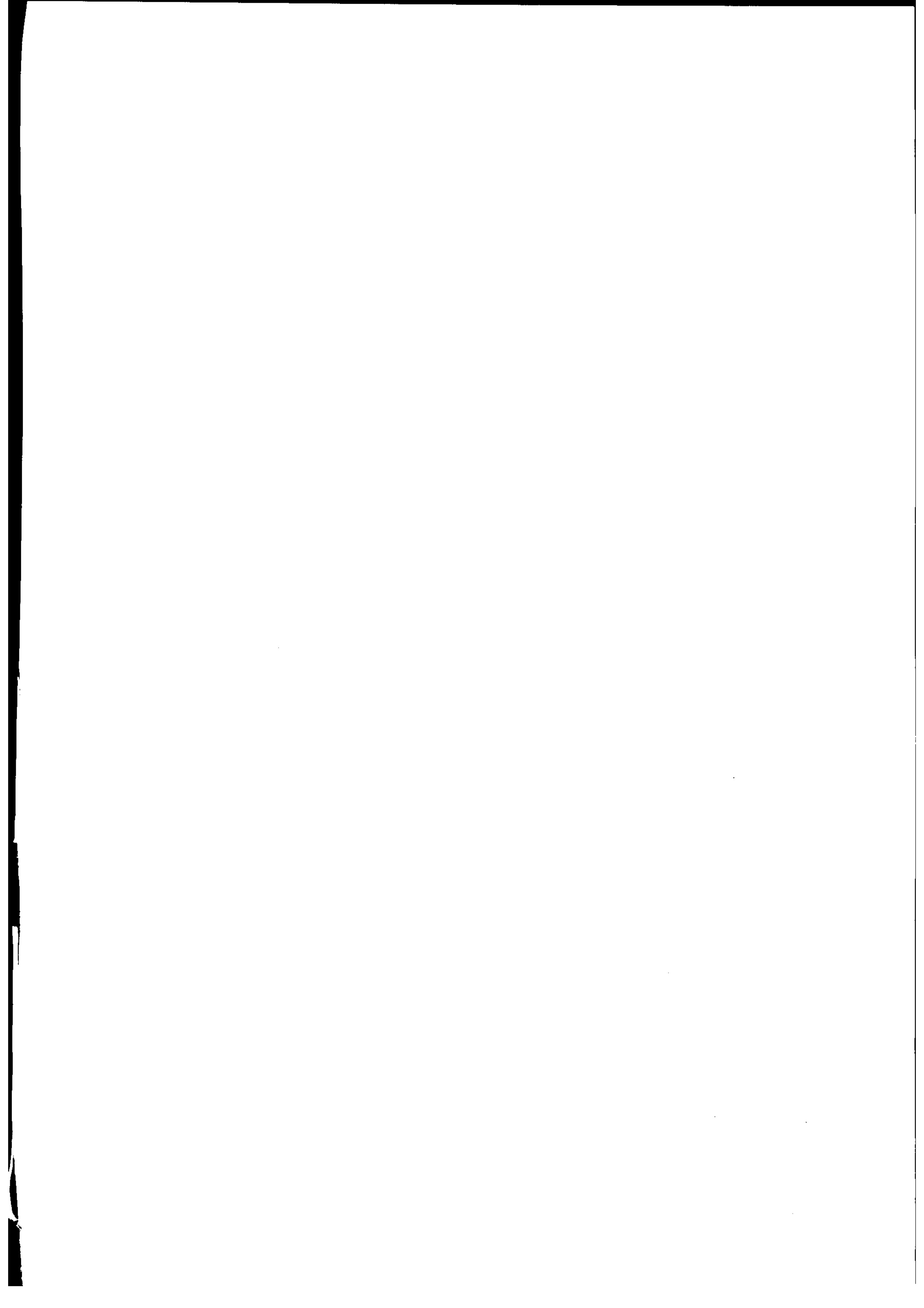
رقـم المعمـل : ____________________

ارسم أشكال النمو للميكروبات على بيئة EMB



ارسم أشكال نمو للميكروبات على بيئة Sodium azide .





تقــريـر ٤٤

الاســــم : ______________________

رقـم المعمــل : ______________________

جدول تعريف DESCRIPTIVE CHART

تعريف مزرعة بكتيرية مجهولة

الاســم : ______________________

رقم المعمل : ______________________

رقم المزرعة : ______________________

الجنس : ______________________

الجز الأول : الشكل المورفولوجى

الخلايا الخضرية

الشكل : كروى ـ عصوى قصير ـ عصوى طويل ـ خيطى ـ واو ـ حلزونى .

الترتيب : خلايا مفرده ـ أزواج ـ سلاسل ـ مربعات ـ مكعبات ـ غير منتظمة .

العلبة : موجودة ـ غير موجودة .

نتيجة الصبغ : صبغة جرام ______________

الحركة : موجودة ـ غير موجودة

الجراثيم : موجودة ـ غير موجودة

وضع الجراثيم : وسطى ـ قريب من الطرف ـ طرفى

الجزء الثانى : الصفات المزرعية

المستعمرة :

البيئة : ______________ العمر ______________

النمو : بطئ ـ سريع ـ متوسط

الشكل : رأس الدبوس ـ دائرى ـ شبه جذرى ـ غير منتظم

السطح : ناعم ـ خشن ـ جاف ـ رطب ـ معتم ـ لامع

الارتفاع : مسطح ـ مرتفع

الحافة : كاملة ـ متموجة ـ خيطية

الآجار المائل :

البيئة : ______________________

النمو : ضعيف ـ متوسط ـ قوى

الشكل : شبه خيطى ـ محبب *beaded* ـ منتشر ـ شبه جذرى

الارتفاع : مستوٍ ـ مرتفع

الصفات الضوئية : معتم ـ شفاف ـ نصف شفاف ـ ملون

اللون : ______________ ذائب فى الماء ـ غير ذائب فى الماء

القوام : ثقيل ـ لزج ـ هش

المرق (السائلة)

البيئة : ______________________

النمو السطحى : حلقة ـ طبقة علوية ـ غير موجود

العكارة : قليلة ـ كثيفة ـ غير موجودة

كمية الراسب : كثير ـ قليل ـ غير موجود

نوع الراسب : قشور ـ حبيبى ـ مخاطى عند الرج

العلاقة بالأكسجين ______________ فى بيئة ______________

درجة الحرارة المثلى للنمو ______________ ° م

الجزء الثالث : الصفات الفسيولوجية

بيئة الجلاتين

تحلل الجلاتين : لايوجد ــ بطيء ــ متوسط ــ تام

لبن عباد الشمس

الاختزال : قليل ــ متوسط ــ تام ــ لايوجد

مدة التحضين : ______________

التخمر :

الجلوكوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ______________

اللاكتوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ______________

السكروز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ______________

الجزء الرابع : معلومات إضافية

بيئة آجار إندو Endo أو آجار أزرق المثيلين

النمو : موجود ــ غير موجود

اللون : موجود ــ غير موجود

اللمعان المعدنى : موجود ــ غير موجود

الاختبارات الخاصة (وضح موجب أم سالب)

الإندول

أحمر الميثيل

أستيل ميثيل كربينول

الاكسيديز

بيئة مح البيض

نزع الكربوكسيل من الليسين

نزع الكربوكسيل من الارنيثين

نزع الامين من الفينيل الآنين

اختبار الكاتاليز

تحلل النشا

تحلل الكازين

اختبار اليوريا

استخدام السترات

تقـــريـر ٤٥

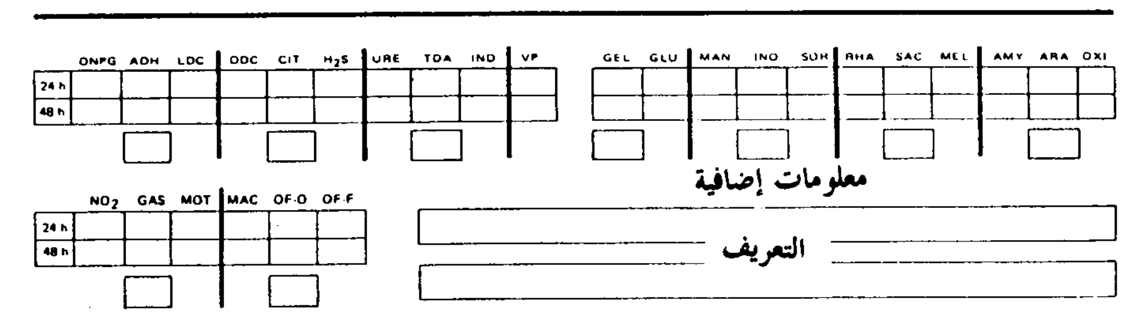
الطرق المتعددة الاختبارات ، والدقيقة الحجم لتعريف البكتيريا المعوية

الاســـــم : ________________

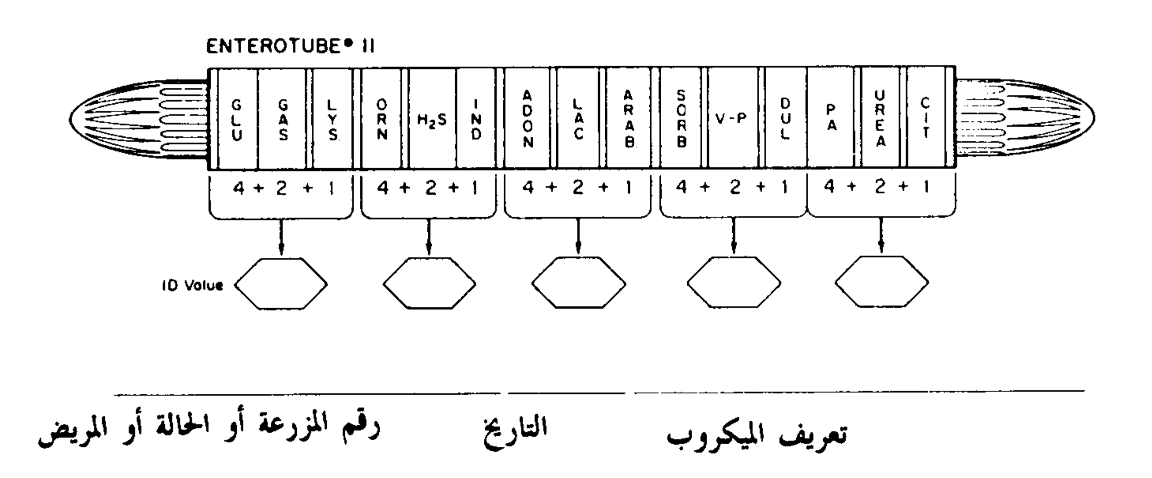
رقــم المعمــل : ________________

سجل نتائج شريط API ، أو نتائج Enterotube II وعرف الميكروب .

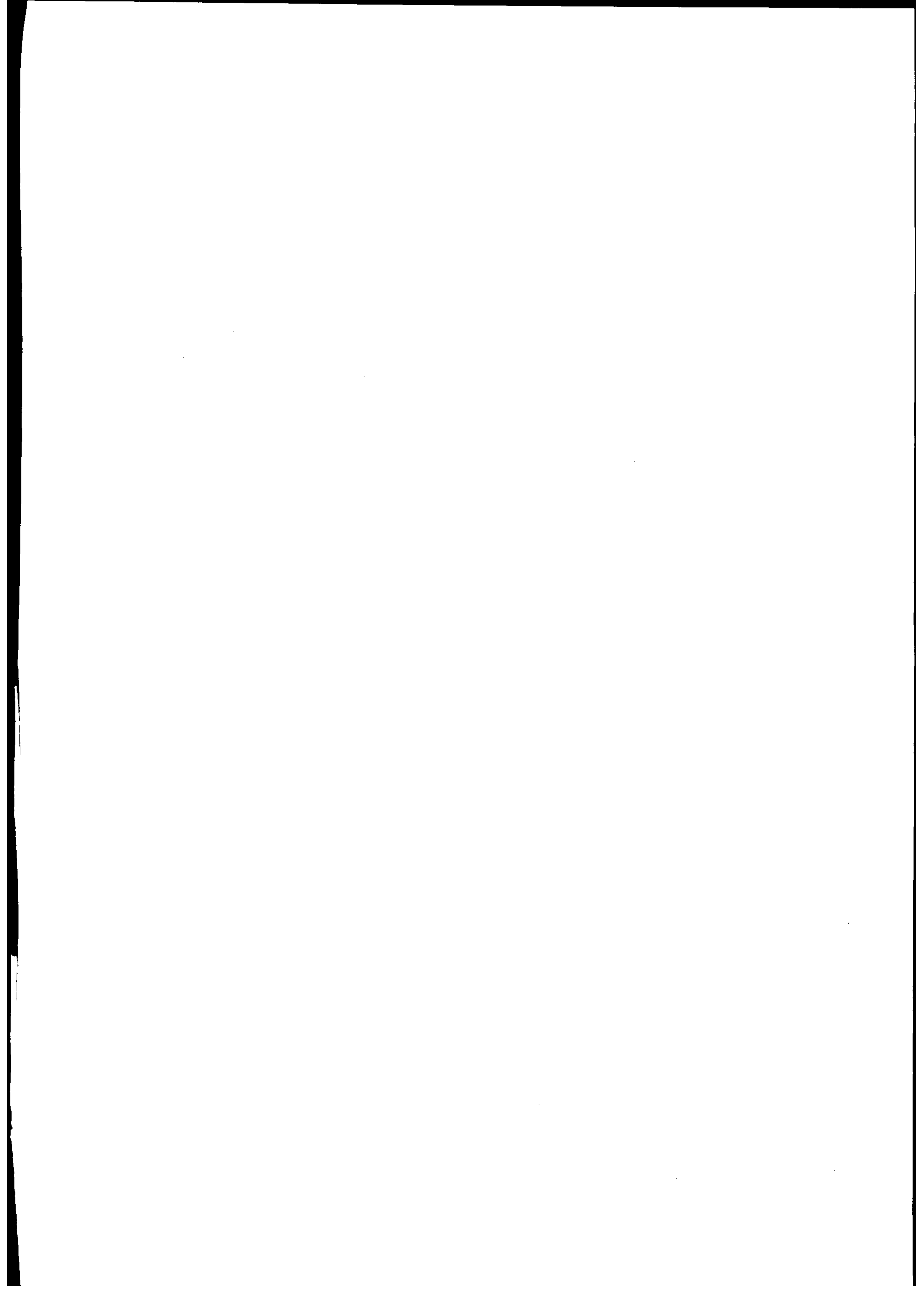
طريقة API



طريقة Enterotube II



تعريف الميكروب ________ التاريخ ________ رقم المزرعة أو الحالة أو المريض ________



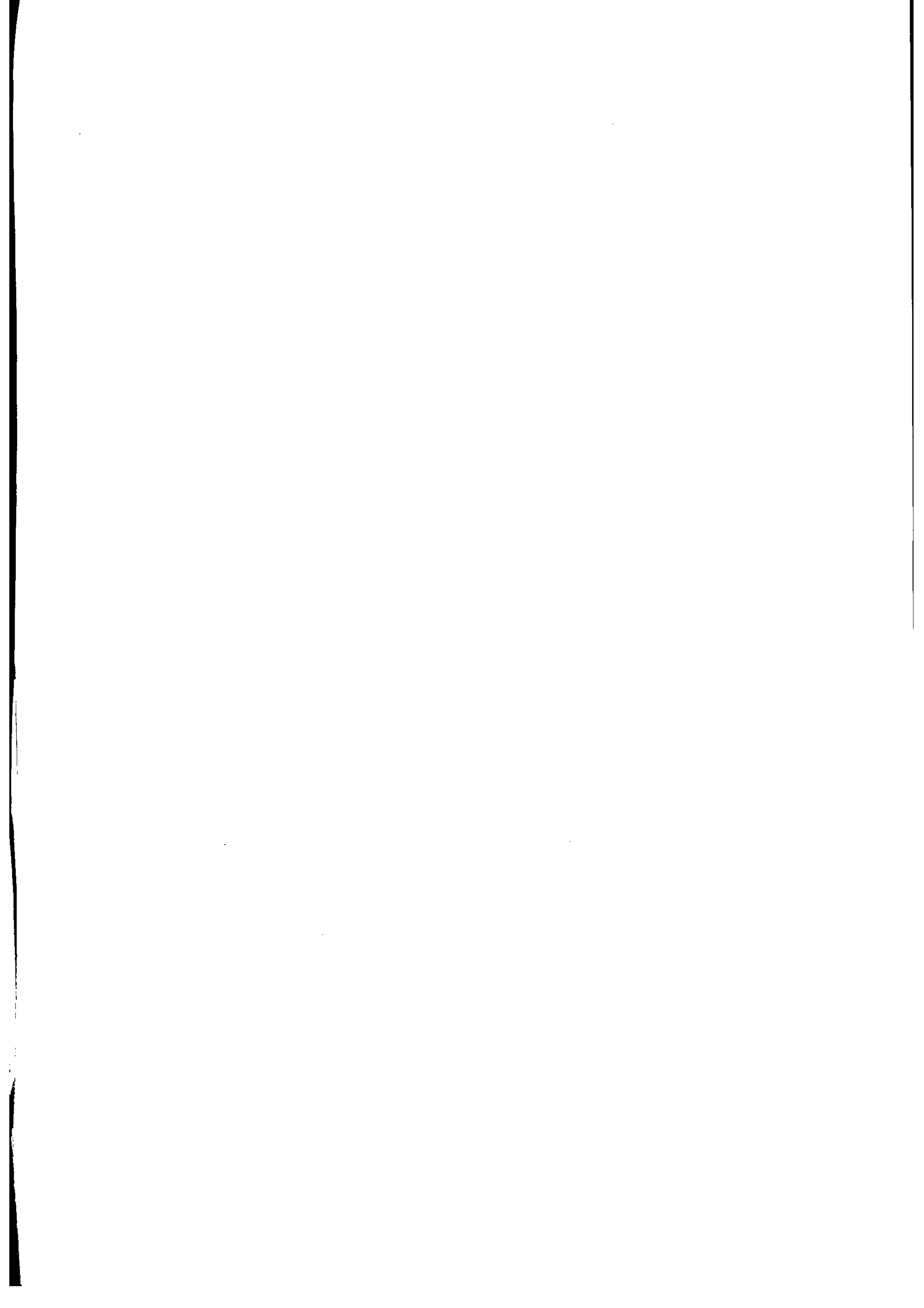
تقــريـر ٤٦

الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

التعريف المورروفولوجي لبعض البكتيريا ذات الصفات الخاصة

سجل التعريف المحتمل لأجناس المزارع غير المعرفة الموجودة أمامك . وضح الدلائل الميكروسكوبية ، أو غيرها التى اعتمدت عليها فى استنتاجاتك .



تقــريـر ٤٧

الاســــم : ______________________

عزل جنس Bacillus

رقــم المعمــل : ______________________

صف الطريقة التى اتبعتها لعزل أحد أنواع جنس الـ Bacillus . وضح فى تقريرك المصدر ، واستعرض الأسباب والاختبارات الأساسية التى استخدمتها فى التعريف ، واستخدم جدول التعريف التالى لتسجيل النتائج .

جدول تعريف DESCRIPTIVE CHART

عـزل جنـــس Bacillus

الاســم : ____________

رقم المعمل : ____________

رقم المزرعة : ____________

الجنس : ____________

الجز الأول : الشكل المورفولوجى

الخلايا الخضرية

الشكل : كروى ــ عصوى قصير ــ عصوى طويل خيطى ــ واوٍ ــ حلزونى .

الترتيب : خلايا مفرده ــ أزواج ــ سلاسل ــ مربعات ــ مكعبات ــ غير منتظمة .

العلبة : موجودة ــ غير موجودة .

نتيجة الصبغ : صبغة جرام ____________

الحركة : موجودة ــ غير موجودة

الجراثيم : موجودة ــ غير موجودة

وضع الجراثيم : وسطى ــ قريب من الطرف ــ طرفى

الجزء الثانى : الصفات المزرعية

المستعمرة :

البيئة : ____________ العمر ____________

النمو : بطئ ــ سريع ــ متوسط

الشكل : رأس الدبوس ــ دائرى ــ شبه جذرى ــ غير منتظم

السطح : ناعم ــ خشن ــ جاف ــ رطب ــ معتم ــ لامع

الارتفاع : مسطح ــ مرتفع

الحافة : كاملة ــ متموجة ــ خيطية

الآجار المائل :

البيئة : ____________

النمو : ضعيف ــ متوسط ــ قوى

الشكل : شبه خيطى ــ محبب *beaded* ــ منتشر ــ شبه جذرى

الارتفاع : مستوٍ ــ مرتفع

الصفات الضوئية : معتم ــ شفاف ــ نصف شفاف ــ ملون

اللون : ____________ ذائب فى الماء ــ غير ذائب فى الماء

القوام : ثقيل ــ لزج ــ هش

المرق (السائلة)

البيئة : ____________

النمو السطحى : حلقة ــ طبقة علوية ــ غير موجود

العكارة : قليلة ــ كثيفة ــ غير موجودة

كمية الراسب : كثير ــ قليل ــ غير موجود

نوع الراسب : قشور ــ حبيبى ــ مخاطى عند الرج

العلاقة بالأكسجين ____________ فى بيئة ____________

درجة الحرارة المثلى للنمو ____________ ° م

الجزء الثالث : الصفات الفسيولوجية

بيئة الجلاتين

تحلل الجلاتين : لايوجد ــ بطئ ــ متوسط ــ تام

لبن عباد الشمس

الاختزال : قليل ــ متوسط ــ تام ــ لايوجد

مدة التحضين : ____________

التخمر :

الجلوكوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ــــــــــــــــ

اللاكتوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ــــــــــــــــ

السكروز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ــــــــــــــــ

الجزء الرابع : معلومات إضافية

بيئة آجار إندو Endo أو آجار أزرق المثيلين

النمو : موجود ــ غير موجود

اللون : موجود ــ غير موجود

اللمعان المعدنى : موجود ــ غير موجود

الاختبارات الخاصة (وضح موجب أم سالب)

الإندول

أحمر الميثيل

أستيل ميثيل كربينول

الاكسيديز

بيئة مح البيض

نزع الكربوكسيل من الليسين

نزع الكربوكسيل من الارنيثين

نزع الامين من الفينيل الآنين

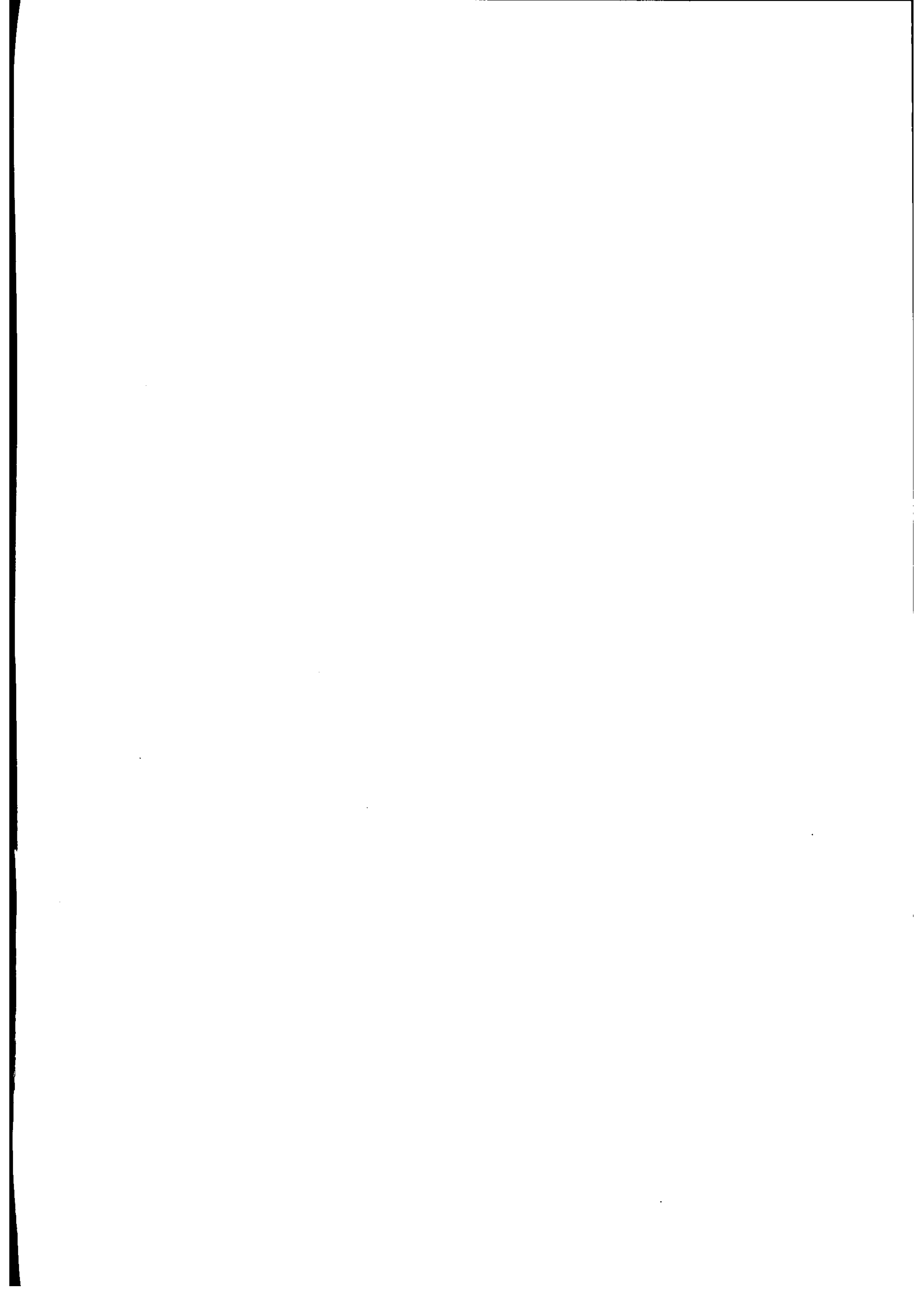
اختبار الكاتاليز

تحلل النشا

تحلل الكازين

اختبار اليوريا

استخدام السترات



تقـــرير ٤٨

الاســــــم : ____________________

عزل الـ Pseudomonad

رقــم المعمــل : ____________________

صف الطريقة التى استخدامتها لعزل بكتيريا السيدوموناس - سجل المعلومات الهامة مثل : المصدر ، واستعرض الأسباب والاختبارات الأساسية التى استخدمت فى التعريف . استخدم جدول التعريف المرفق .

جدول تعريف DESCRIPTIVE CHART

عـزل جنـــس *Pseudomonas*

الاســم : ______________

رقم المعمل : ______________

رقم المزرعة : ______________

الجنس : ______________

الجز الأول : الشكل المورفولوجى

الخلايا الخضرية

الشكل : كروى ــ عصوى قصير ــ عصوى طويل ــ خيطى ــ واوٍ ــ حلزونى .

الترتيب : خلايا مفردة ــ أزواج ــ سلاسل ــ مربعات ــ مكعبات ــ غير منتظمة .

العلبة : موجودة ــ غير موجودة .

نتيجة الصبغ : صبغة جرام ______________

الحركة : موجودة ــ غير موجودة

الجراثيم : موجودة ــ غير موجودة

وضع الجراثيم : وسطى ــ قريب من الطرف ــ طرف

الجزء الثانى : الصفات المزرعية

المستعمرة :

البيئة : ______________ العمر ______________

النمو : بطئ ــ سريع ــ متوسط

الشكل : رأس الدبوس ــ دائرى ــ شبه جذرى ــ غير منتظم

السطح : ناعم ــ خشن ــ جاف ــ رطب ــ معتم ــ لامع

الارتفاع : مسطح ــ مرتفع

الحافة : كاملة ــ متموجة ــ خيطية

الآجار المائل :

البيئة : ______________

النمو : ضعيف ــ متوسط ــ قوى

الشكل : شبه خيطى ــ محبب *beaded* ــ منتشر ــ شبه جذرى

الارتفاع : مستوٍ ــ مرتفع

الصفات الضوئية : معتم ــ شفاف ــ نصف شفاف ــ ملون

اللون : ______________ ذائب فى الماء ــ غير ذائب فى الماء

القوام : ثقيل ــ لزج ــ هش

المرق (السائلة)

البيئة : ______________

النمو السطحى : حلقة ــ طبقة علوية ــ غير موجود

العكارة : قليلة ــ كثيفة ــ غير موجودة

كمية الراسب : كثير ــ قليل ــ غير موجود

نوع الراسب : قشور ــ حبيبى ــ مخاطى عند الرج

العلاقة بالأكسجين ______________ فى بيئة ______________

درجة الحرارة المثلى للنمو ______________ ° م

الجزء الثالث : الصفات الفسيولوجية

بيئة الجلاتين

تحلل الجلاتين : لايوجد ــ بطئ ــ متوسط ــ تام

لبن عباد الشمس

الاختزال : قليل ــ متوسط ــ تام ــ لايوجد

مدة التحضين : ______________

التخمر :

الجلوكوز : حامض — غاز — سالب

مدة التحضين : ____________

اللاكتوز : حامض — غاز — سالب

مدة التحضين : ____________

السكروز : حامض — غاز — سالب

مدة التحضين : ____________

الجزء الرابع : معلومات إضافية

بيئة آجار إندو Endo أو آجار أزرق المثيلين

النمو : موجود — غير موجود

اللون : موجود — غير موجود

اللمعان المعدنى : موجود — غير موجود

الاختبارات الخاصة (وضح موجب أم سالب)

الإندول

أحمر الميثيل

أستيل ميثيل كربينول

الأكسيديز

بيئة مح البيض

نزع الكربوكسيل من الليسين

نزع الكربوكسيل من الارنيثين

نزع الامين من الفينيل الآنين

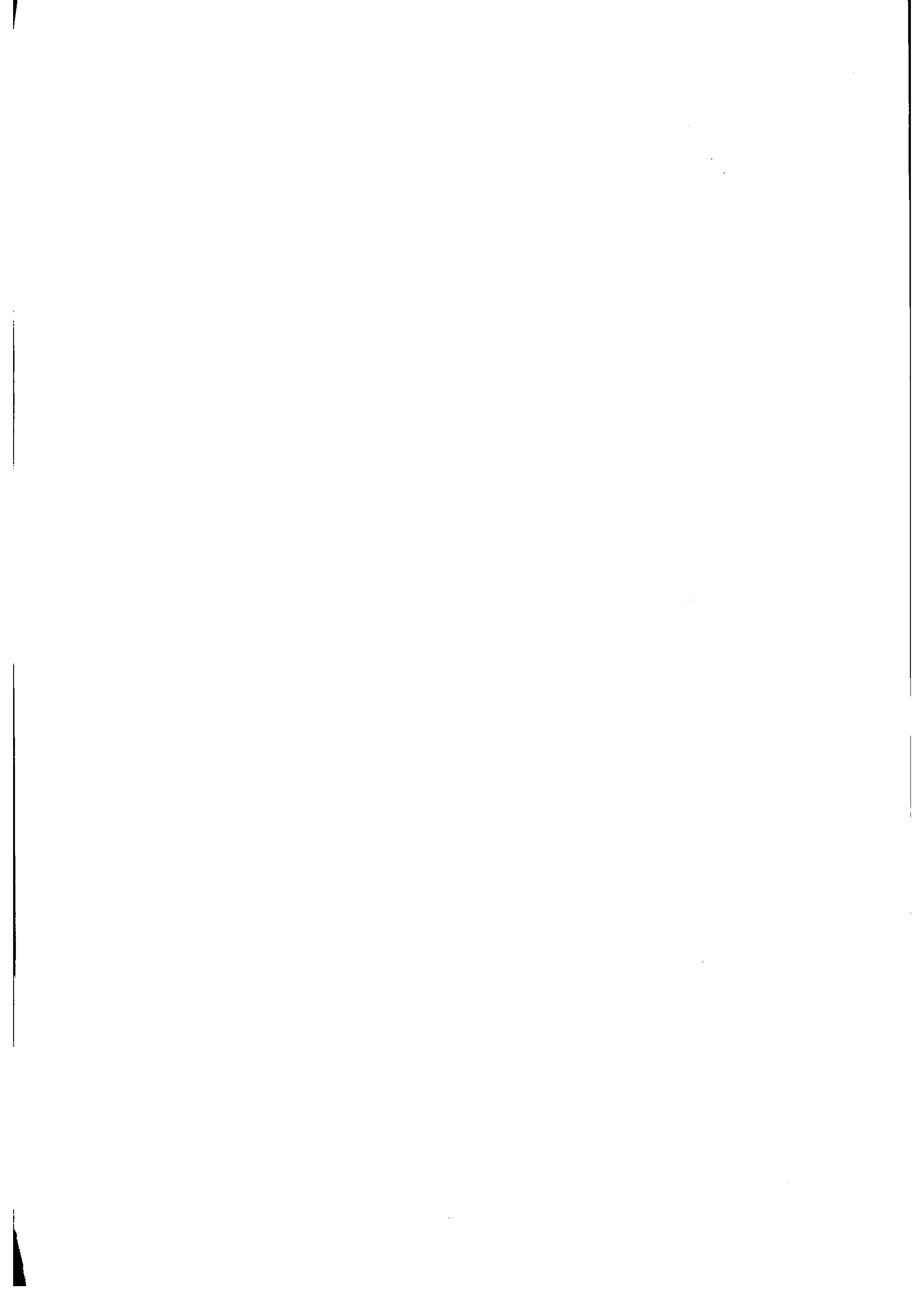
اختبار الكاتاليز

تحلل النشا

تحلل الكازين

اختبار اليوريا

استخدام السترات



تقـــرير ٤٩

الاســــم : ________________

عزل البكتيريا العنقودية (الستافيلوكس)

رقـم المعمـل : ________________

صف الطريقة التى استخدمتها لعزل البكتيريا العنقودية . اذكر المعلومات العامة مثل المصدر ، واستعرض الأسباب والاختبارات الأساسية التى استخدمتها فى التعريف ، واستخدم جدول التعريف التالى لتسجيل النتائج .

جدول تعريف DESCRIPTIVE CHART

عــزل جنـــس *Staphlococcus*

الاســـم : ____________________

رقم المعمل : ____________________

رقم المزرعة : ____________________

الجنس : ____________________

الجز الأول : الشكل المورفولوجي

الخلايا الخضرية

الشكل : كروى — عصوى قصير — عصوى طويل — خيطى — واو — حلزونى .

الترتيب : خلايا مفرده — أزواج — سلاسل — مربعات — مكعبات — غير منتظمة .

العلبة : موجودة — غير موجودة .

نتيجة الصبغ : صبغة جرام ____________

الحركة : موجودة — غير موجودة

الجراثيم : موجودة — غير موجودة

وضع الجراثيم : وسطى — قريب من الطرف — طرفى

الجزء الثانى : الصفات المزرعية

المستعمرة :

البيئة : ____________ العمر ____________

النمو : بطئ — سريع — متوسط

الشكل : رأس الدبوس — دائرى — شبه جذرى — غير منتظم

السطح : ناعم — خشن — جاف — رطب — معتم — لامع

الارتفاع : مسطح — مرتفع

الحافة : كاملة — متموجة — خيطية

الآجار المائل :

البيئة : ____________________

النمو : ضعيف — متوسط — قوى

الشكل : شبه خيطى — محبب *beaded* — منتشر — شبه جذرى

الارتفاع : مستوى — مرتفع

الصفات الضوئية : معتم — شفاف — نصف شفاف — ملون

اللون : ____________ ذائب فى الماء — غير ذائب فى الماء

القوام : ثقيل — لزج — هش

المرق (السائلة)

البيئة : ____________________

النمو السطحى : حلقة — طبقة علوية — غير موجود

العكارة : قليلة — كثيفة — غير موجودة

كمية الراسب : كثير — قليل — غير موجود

نوع الراسب : قشور — حبيبى — مخاطى عند الرج

العلاقة بالأكسجين ____________ فى بيئة ____________

درجة الحرارة المثلى للنمو ____________ ° م

الجزء الثالث : الصفات الفسيولوجية

بيئة الجلاتين

تحلل الجلاتين : لايوجد — بطئ — متوسط — تام

لبن عباد الشمس

الاختزال : قليل — متوسط — تام — لايوجد

مدة التحضين : ____________

التخمر :

الجلوكوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ____________

اللاكتوز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ____________

السكروز : حامض ــ غاز ــ سالب

مدة التحضين : ____________

الجزء الرابع : معلومات إضافية

بيئة آجار إندو Endo أو آجار أزرق المثيلين

النمو : موجود ــ غير موجود

اللون : موجود ــ غير موجود

اللمعان المعدنى : موجود ــ غير موجود

الاختبارات الخاصة (وضح موجب أم سالب)

الإندول

أحمر الميثيل

أستيل ميثيل كربينول

الأكسيديز

بيئة مح البيض

نزع الكربوكسيل من الليسين

نزع الكربوكسيل من الارنيثين

نزع الامين من الفينيل الآنين

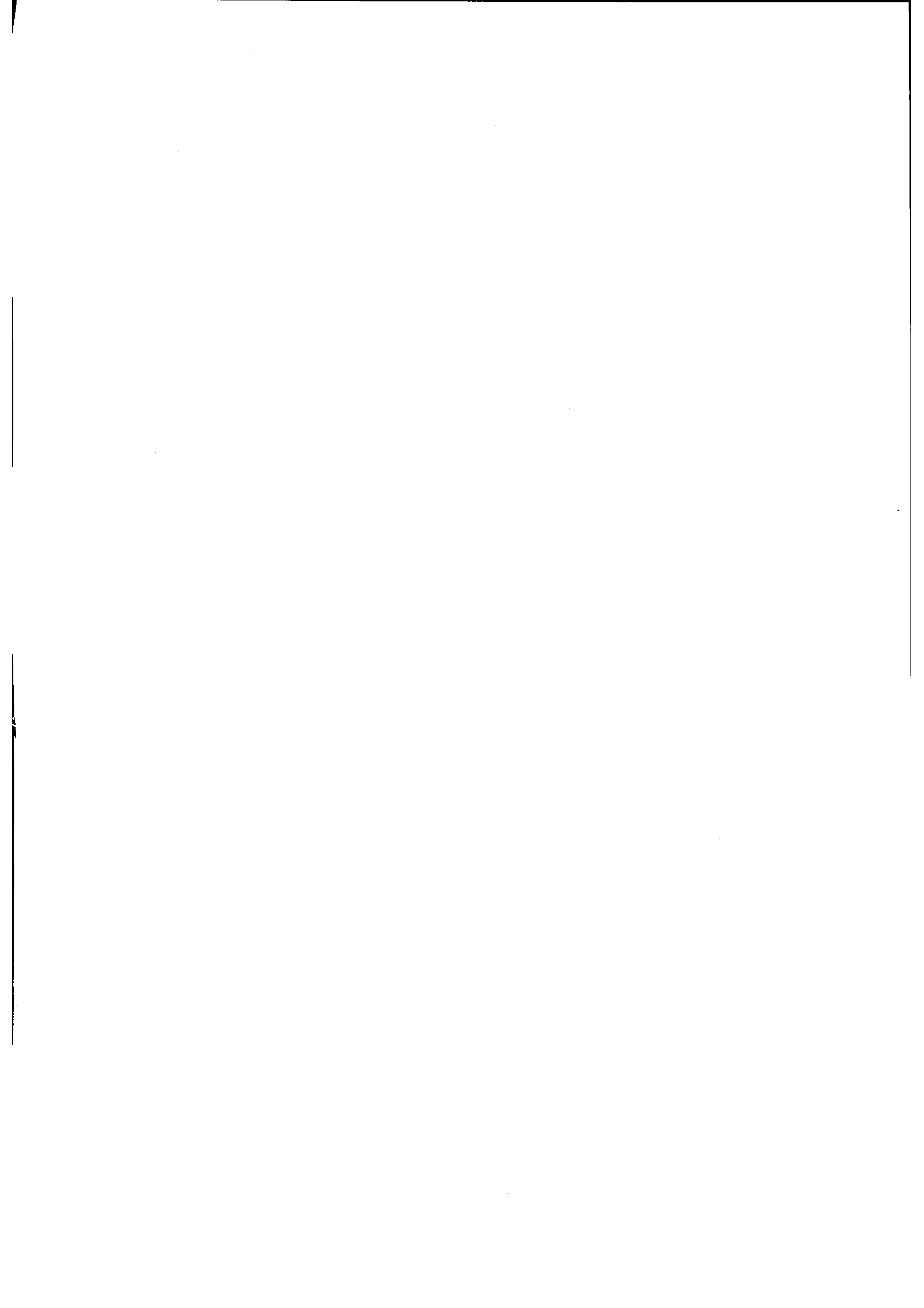
اختبار الكاتاليز

تحلل النشا

تحلل الكازين

اختبار اليوريا

استخدام السترات



تقــريــر ٥٠

الإســــــم : ________________

عزل بكتيريا حامض اللاكتيك

رقــم المعمــل : ________________

صف الطريقة التى اتبعتها فى عزل أحد بكتيريا حامض اللاكتيك . وضح فى تقريرك المعلومات الهامة مثل : المصدر واستعرض الأسباب ، والاختبارات الأساسية التى استخدمتها فى التعريف ، واستخدم جدول التعريف التالى لتسجيل النتائج .

جدول تعريف DESCRIPTIVE CHART

عـزل بكتــيريـا حـامــض اللاكتيــك

الاســم : ________________

رقم المعمل : ________________

رقم المزرعة : ________________

الجنس : ________________

الجز الأول : الشكل المورفولوجي

الخلايا الخضرية

الشكل : كروى ــ عصوى قصير ــ عصوى طويل ــ خيطى ــ واو ــ حلزونى .

الترتيب : خلايا مفرده ــ أزواج ــ سلاسل ــ مربعات ــ مكعبات ــ غير منتظمة .

العلبة : موجودة ــ غير موجودة .

نتيجة الصبغ : صبغة جرام ________

الحركة : موجودة ــ غير موجودة

الجراثيم : موجودة ــ غير موجودة

وضع الجراثيم : وسطى ــ قريب من الطرف ــ طرف

الجزء الثانى : الصفات المزرعية

المستعمرة :

البيئة : ________ العمر ________

النمو : بطئ ــ سريع ــ متوسط

الشكل : رأس الدبوس ــ دائرى ــ شبه جذرى ــ غير منتظم

السطح : ناعم ــ خشن ــ جاف ــ رطب ــ معتم ــ لامع

الارتفاع : مسطح ــ مرتفع

الحافة : كاملة ــ متموجة ــ خيطية

الآجار المائل :

البيئة : ________________

النمو : ضعيف ــ متوسط ــ قوى

الشكل : شبه خيطى ــ محبب *beaded* ــ منتشر ــ شبه جذرى

الارتفاع : مستوى ــ مرتفع

الصفات الضوئية : معتم ــ شفاف ــ نصف شفاف ــ ملون

اللون : ________ ذائب فى الماء ــ غير ذائب فى الماء

القوام : ثقيل ــ لزج ــ هش

المرق (السائلة)

البيئة : ________________

النمو السطحى : حلقة ــ طبقة علوية ــ غير موجود

العكارة : قليلة ــ كثيفة ــ غير موجودة

كمية الراسب : كثير ــ قليل ــ غير موجود

نوع الراسب : قشور ــ حبيبى ــ مخاطى عند الرج

العلاقة بالأكسجين ________ فى بيئة ________

درجة الحرارة المثلى للنمو ________ ° م

الجزء الثالث : الصفات الفسيولوجية

بيئة الجلاتين

تحلل الجلاتين : لايوجد ــ بطئ ــ متوسط ــ تام

لبن عباد الشمس

الاختزال : قليل ــ متوسط ــ تام ــ لايوجد

مدة التحضين : ________________

التخمر :

الجلوكوز : حامض ـــ غاز ـــ سالب

مدة التحضين : ـــــــــــــــ

اللاكتوز : حامض ـــ غاز ـــ سالب

مدة التحضين : ـــــــــــــــ

السكروز : حامض ـــ غاز ـــ سالب

مدة التحضين : ـــــــــــــــ

الجزء الرابع : معلومات إضافية

بيئة آجار إندو Endo أو آجار أزرق المثيلين

النمو : موجود ـــ غير موجود

اللون : موجود ـــ غير موجود

اللمعان المعدنى : موجود ـــ غير موجود

الاختبارات الخاصة (وضح موجب أم سالب)

الإندول

أحمر الميثيل

أستيل ميثيل كربينول

الأكسيديز

بيئة مح البيض

نزع الكربوكسيل من الليسين

نزع الكربوكسيل من الارنيثين

نزع الامين من الفينيل الآنين

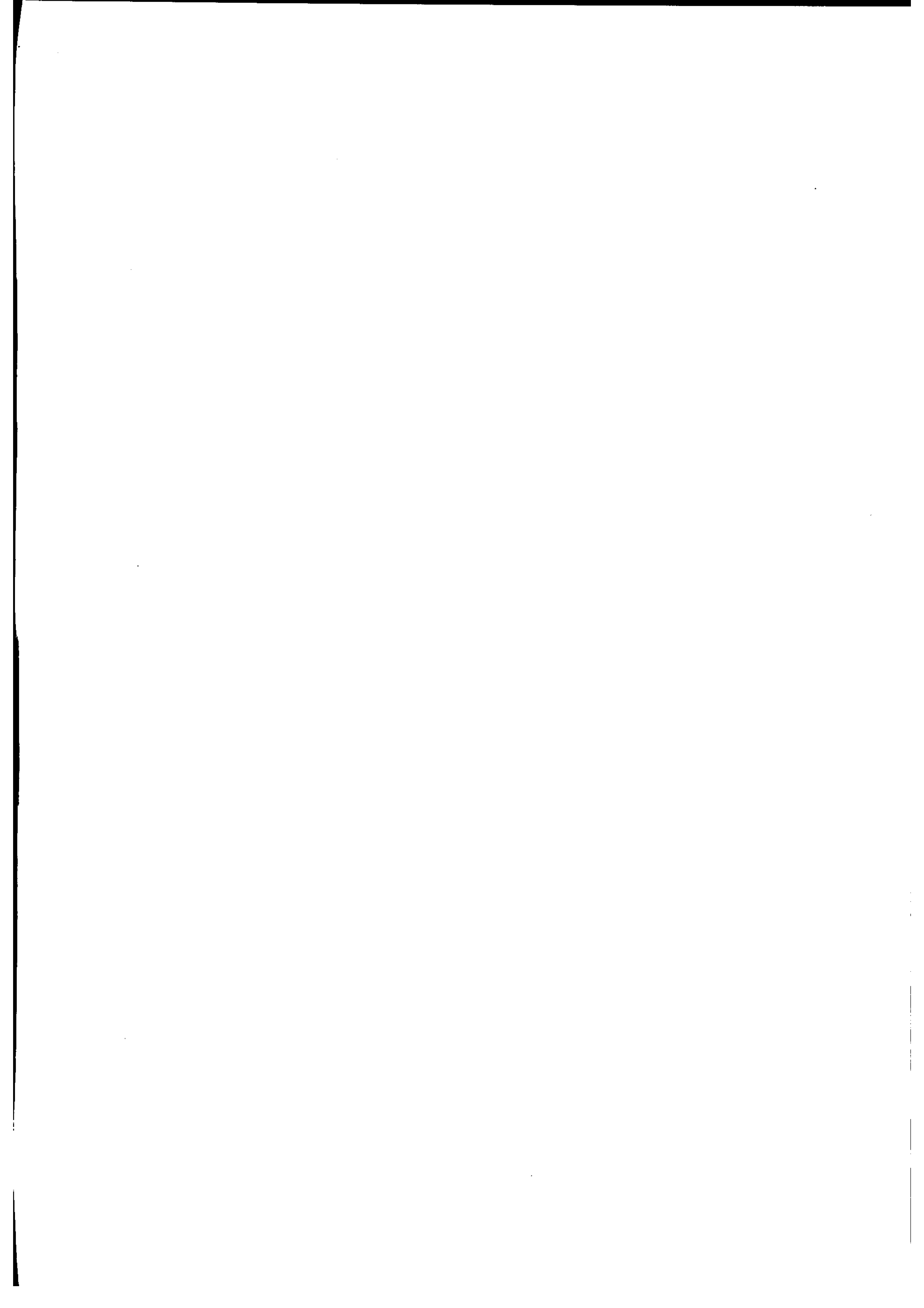
اختبار الكاتاليز

تحلل النشا

تحلل الكازين

اختبار اليوريا

استخدام السترات



تقـــرير ٥١

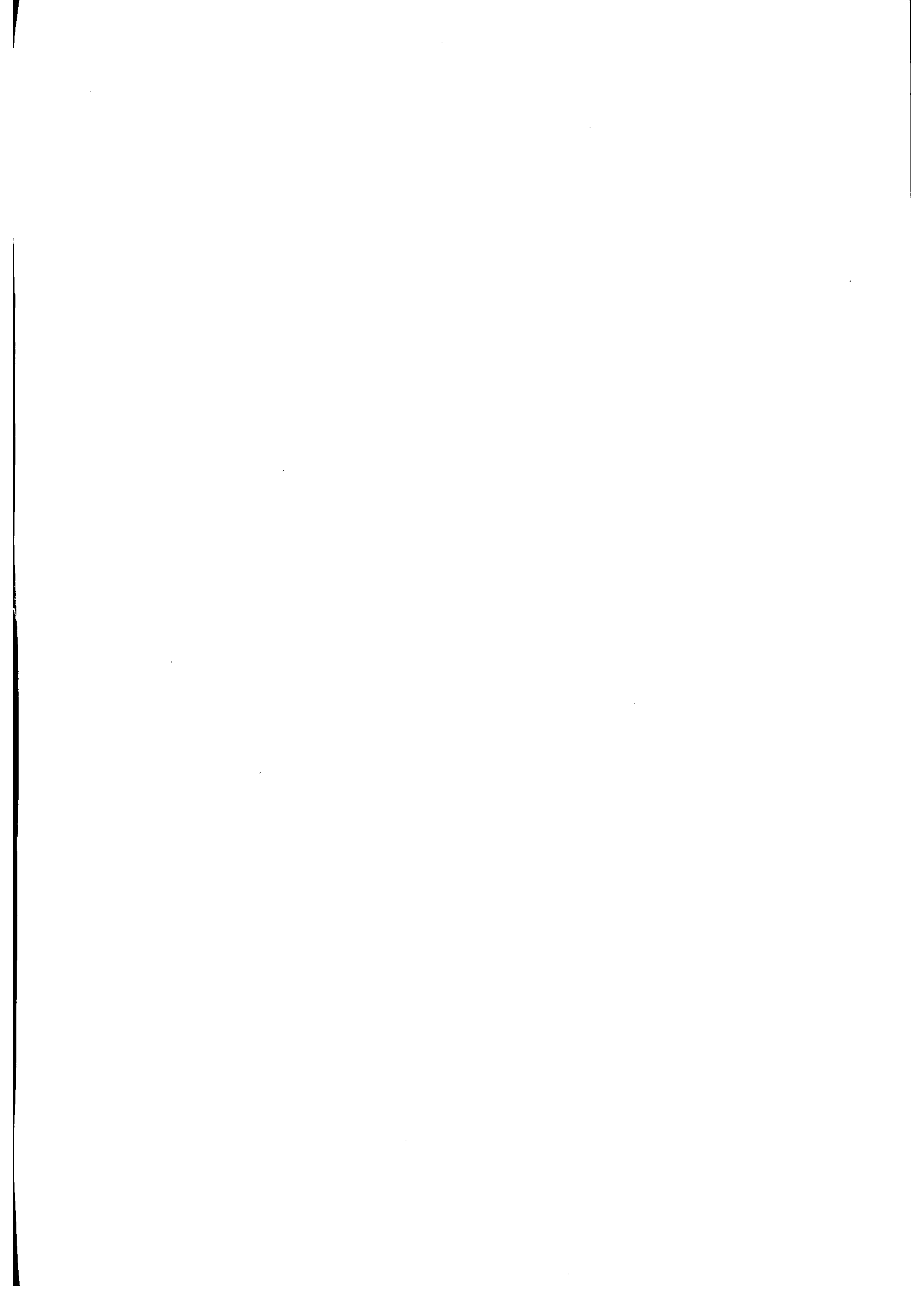
التغيرات البكتيرية

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

سجل نتائج إنتاج ميكروب *Serratia marcescens* للصبغات

درجـــة التحضـــين	اللـــــــــون
٢٥°م	
٣٧°م	



تقـــرير ٥٢

استحثاث تكوين الإنزيمات

الاســـم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

ارسم العلاقة بين محصول الخلايا وتركيز الفوسفات غير العضوية .

١,٠

٠,٥

محصول الخلايا بالطريقة اللونية عند ٤٢٥ nm

صفر ٤ ٨ ١٢

تركيز الفوسفات (ug / ml)

ارسم العلاقة بين نشاط إنزيم الفوسفاتيز القلوى مقسوما على مقدار الامتصاص الضوئى للنمو ، وبين تركيز الفوسفات .

نشاط إنزيم الفوسفاتيز القلوى / الامتصاص الضوئى للنمو

٢

صفر

٤ ٨ ١٢

تركيز الفوسفات (ug / ml)

تقـــريـر ٥٣

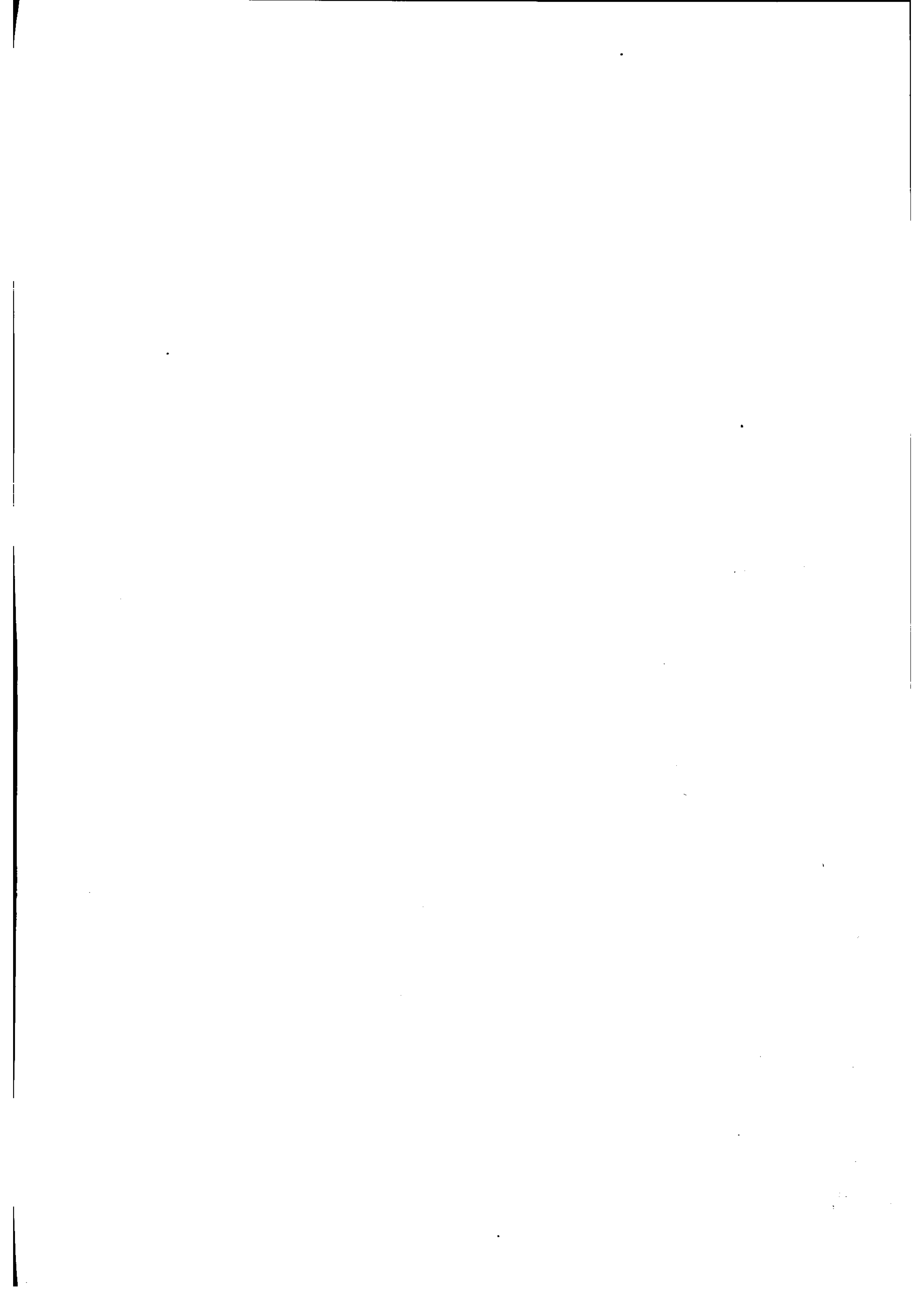
الاســـــم : ____________

رقــم المعمــل : ____________

الطفرات البكتيرية : عزل طفرة مقاومة للإستربتوميسين

سجل مستوى النمو مستخدما المقياس من صفر (عدم نمو) إلى ++++ (نمو غزير) .

اللقـــــاح	تـركـــيز الاستربتوميـــسين		
	صفر مجم	٠,٠١ مجم	٠,٠٥ مجم
مزرعة *Staphylococcus aureus* الأصلية			
مزرعة *Staphylococcus aureus* المقاومة			



تقـــريـر ٥٤

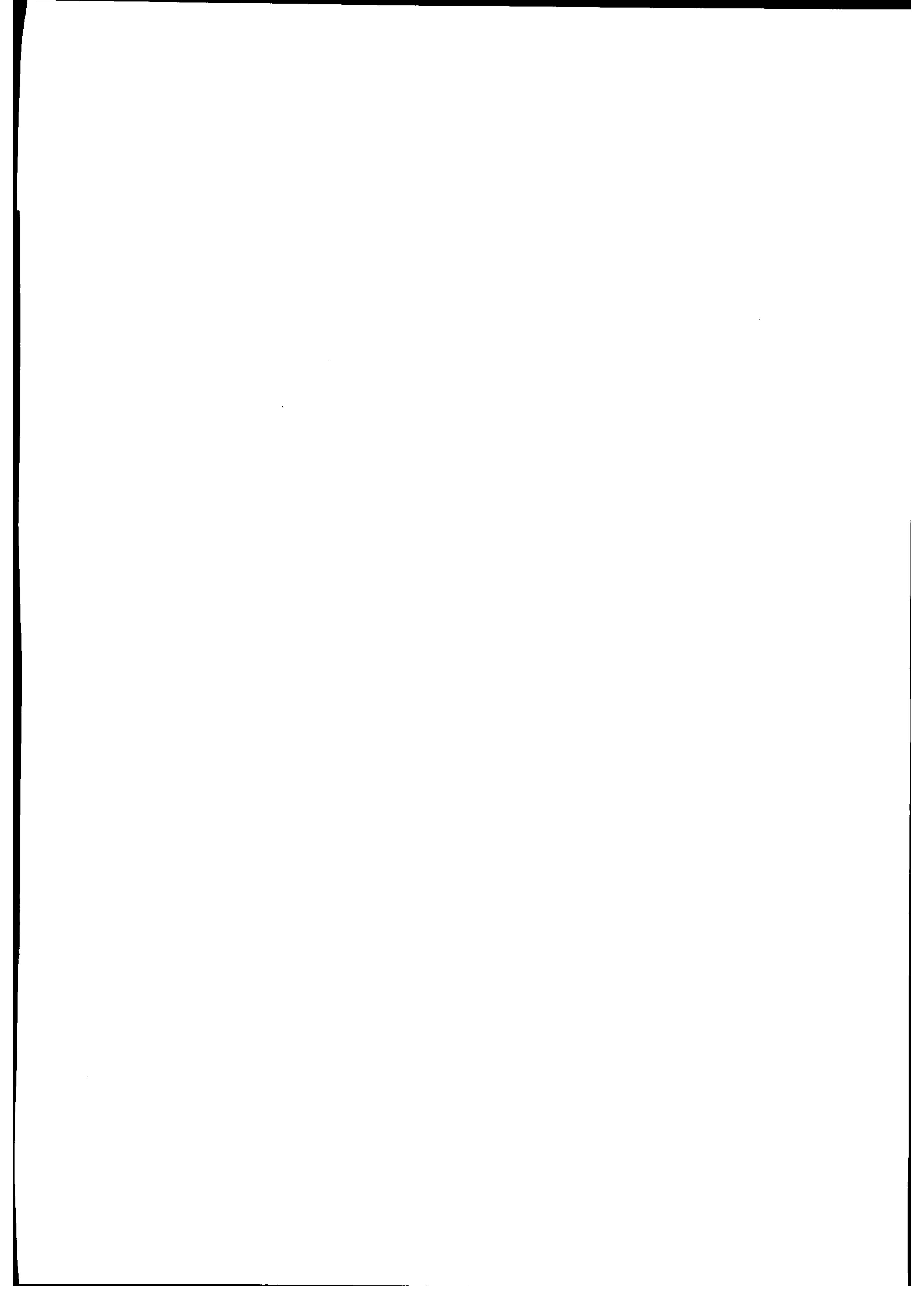
التزاوج البكتيرى

الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

ما هو عدد المستعمرات النامية على بيئة الكفاف التى حدث فيها انتقال للعوامل الوراثية ؟

على أساس الأعداد الأصلية لطفرتى *E. coli* المستخدمين (سوف يمدك المعيد بهذه الأعداد) ، احسب معدل تكوين الخلايا التى حدث فيها تزاوج .



تقــرير ٥٥

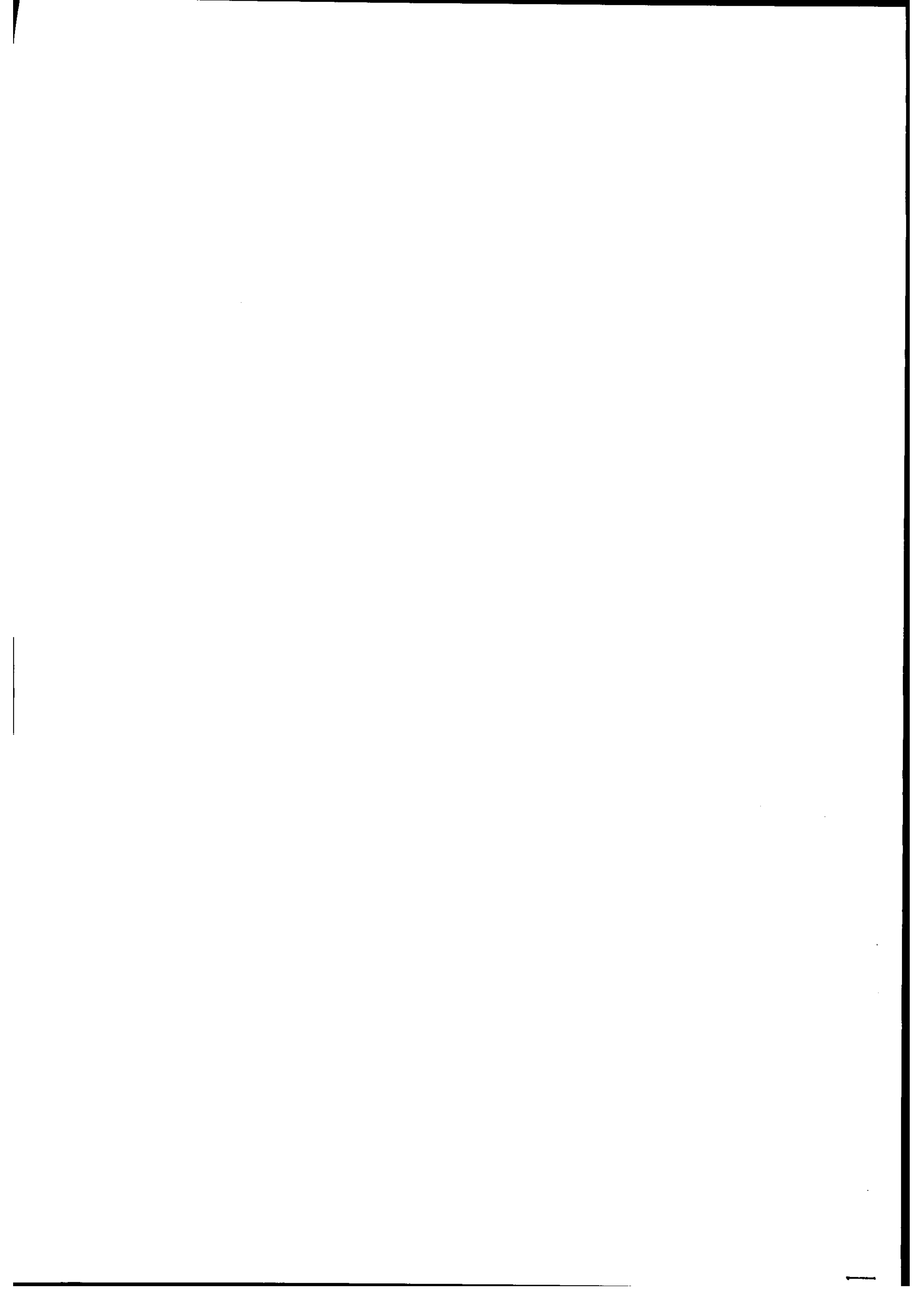
التحول الوراثى البكتيرى

الاســـــم : ______________________

رقــم المعمــل : ______________________

ما هو عدد الخلايا المتحولة النامية على بيئة الكفاف ؟

على أساس أعداد *B. subtilis* المستخدمة فى التجربة (سوف يمدك المعيد بهذه الأعداد) ، احسب النسبة المئوية للخلايا المتحولة .



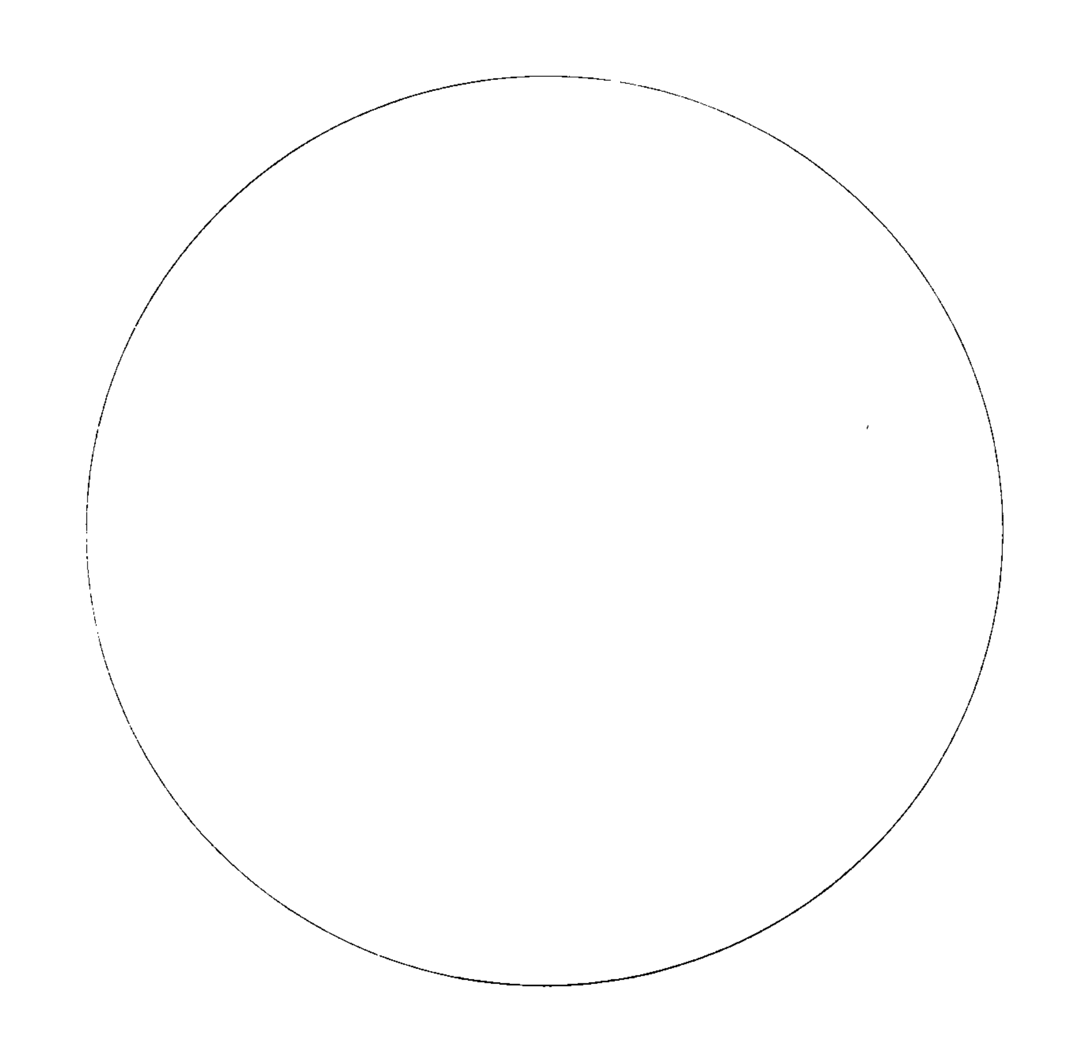
تقـــريـر ٥٦

عزل وخواص البكتيريوفاج

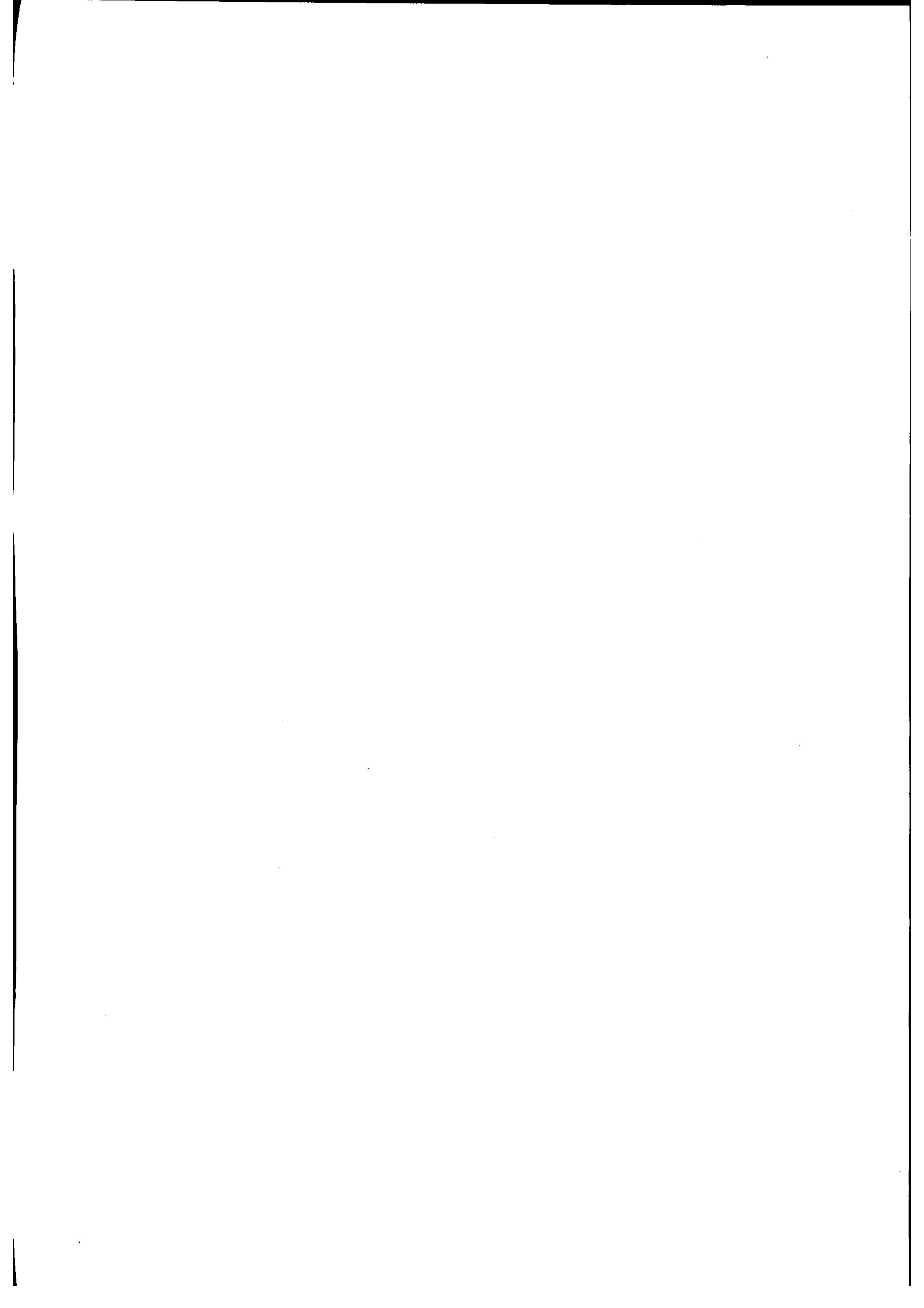
الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

اذكر أعداد ومظهر مناطق التحلل بالفاج phage plaques .



كم من الوقت يلزم لمزرعة *E. coli* مصابة بالفاج لتصبح رائقة ؟



تقـــريـر ٥٧

إنتاج البكتيريوفاج : النمو ذو المرحلة الواحـــــدة

الاســــم : ____________________

رقـم المعمـل : ____________________

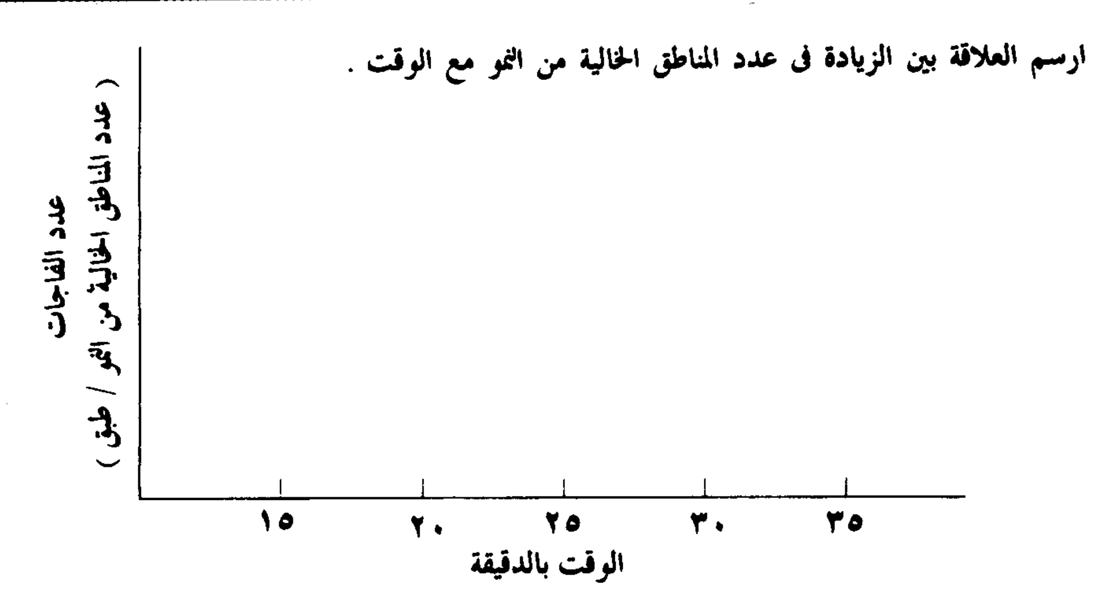
كان العدد الكلى للبكتيريا فى المزرعة الأصلية ________ / مل ، وكان العدد بعد الخطوة السادسة ________ / مل (محسوبة بعد التخفيف) .

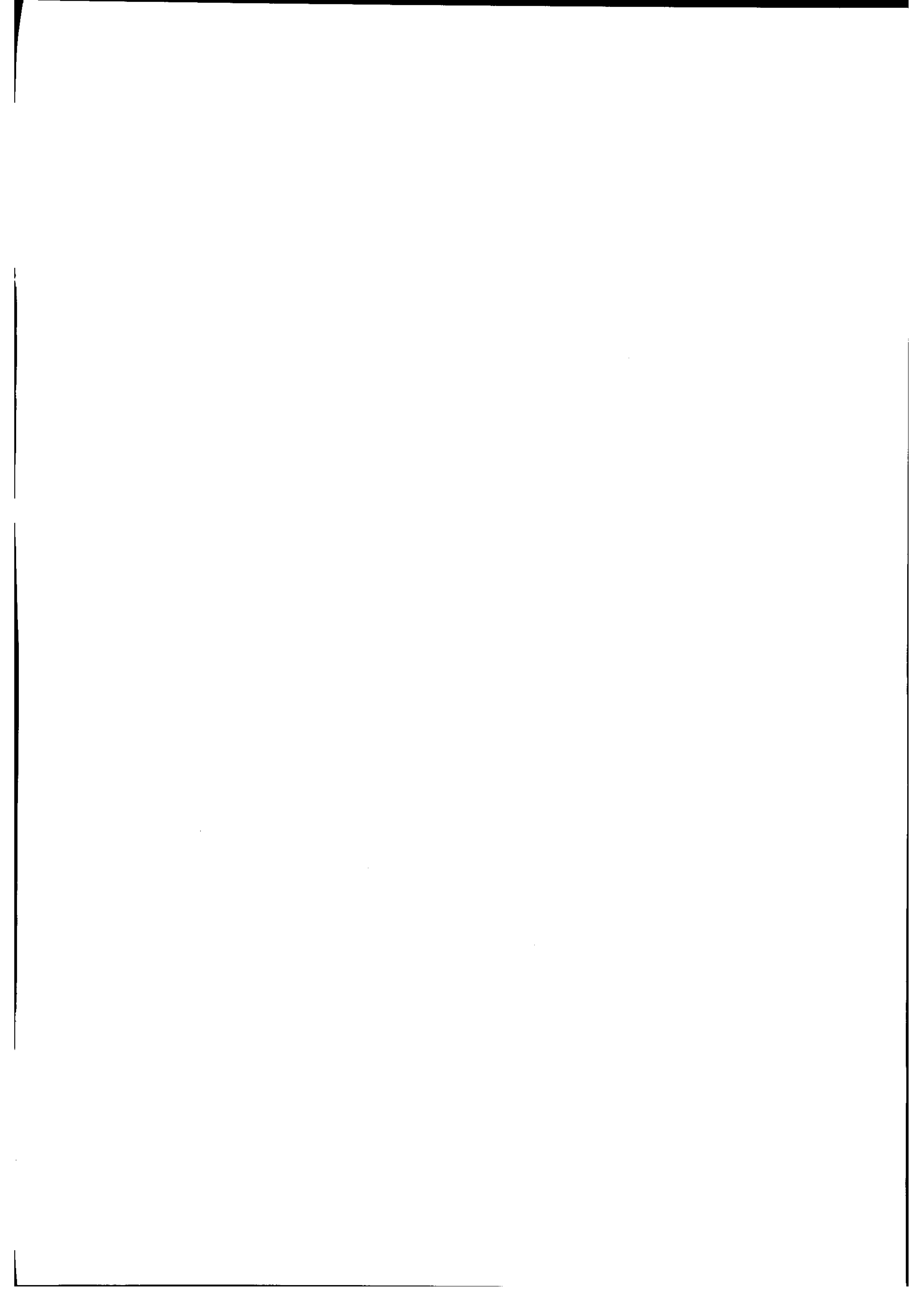
اذكر عدد مناطق الفيروس الخالية من النمو بكل طبق (من الخطوة أ) ، واستكمل الجدول .

عدد حبيبات الفيروس / خلية = عدد المناطق الخالية من النمو مقسوما على عدد البكتيريا (العدد من خطوة ٦) .

الوقت بالدقيقة	عدد المناطق الخالية من النمو بالطبق	عدد حبيبات الفيروس / خلية
٢٠		
٢٥		
٣٠		
٣٥		
٤٠		

ارسم العلاقة بين الزيادة فى عدد المناطق الخالية من النمو مع الوقت .





تقــريـر ٥٨

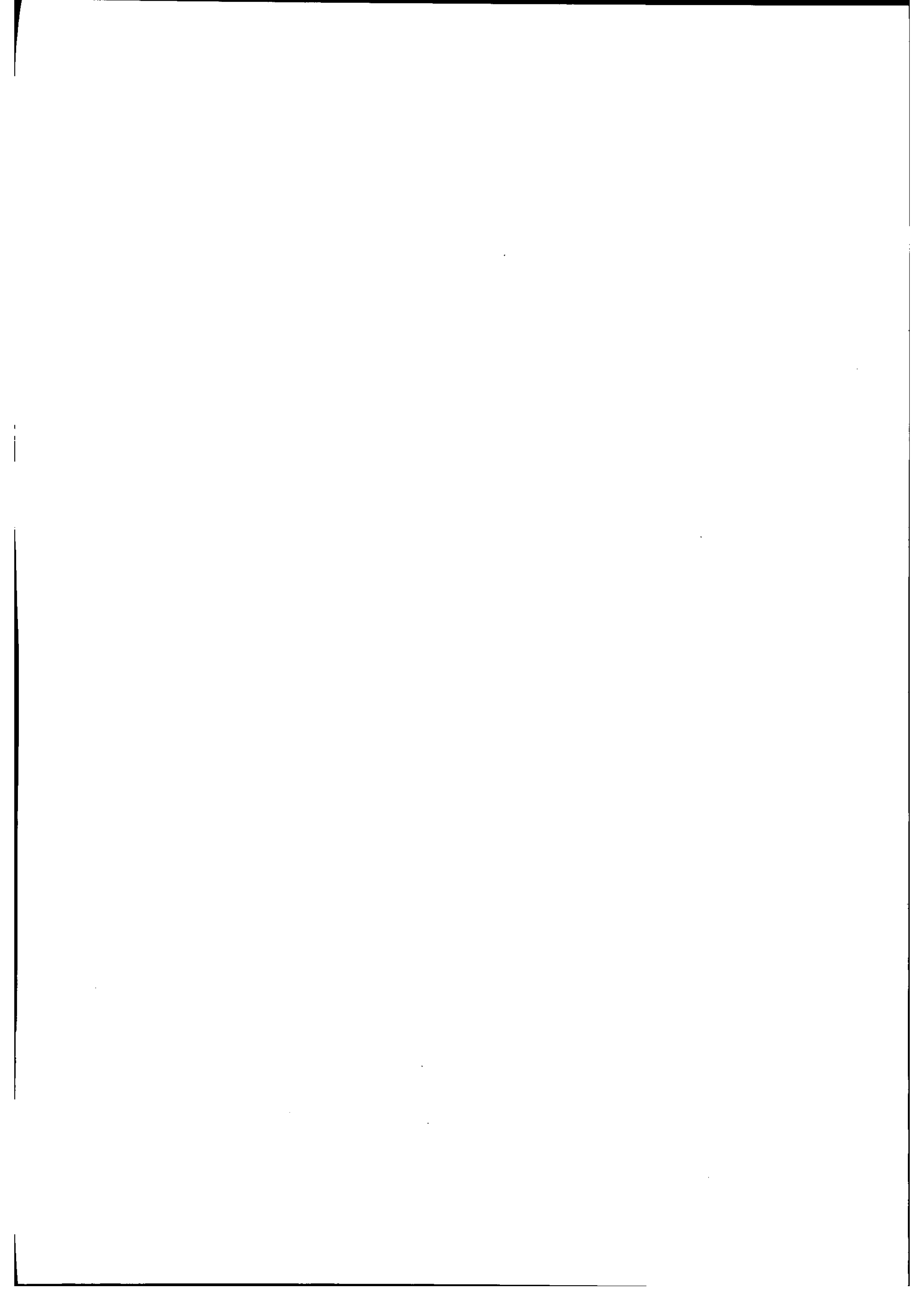
الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

فيروس موزابيك الطباق (الدخان) : العزل وعدوى النباتات

ارسم مظهر مناطق الإصابة الموضعية فى الورقة .

صف مظاهر الإصابة الجهازية لنبات الطباق (الدخان) .



تقــريـر ٥٩

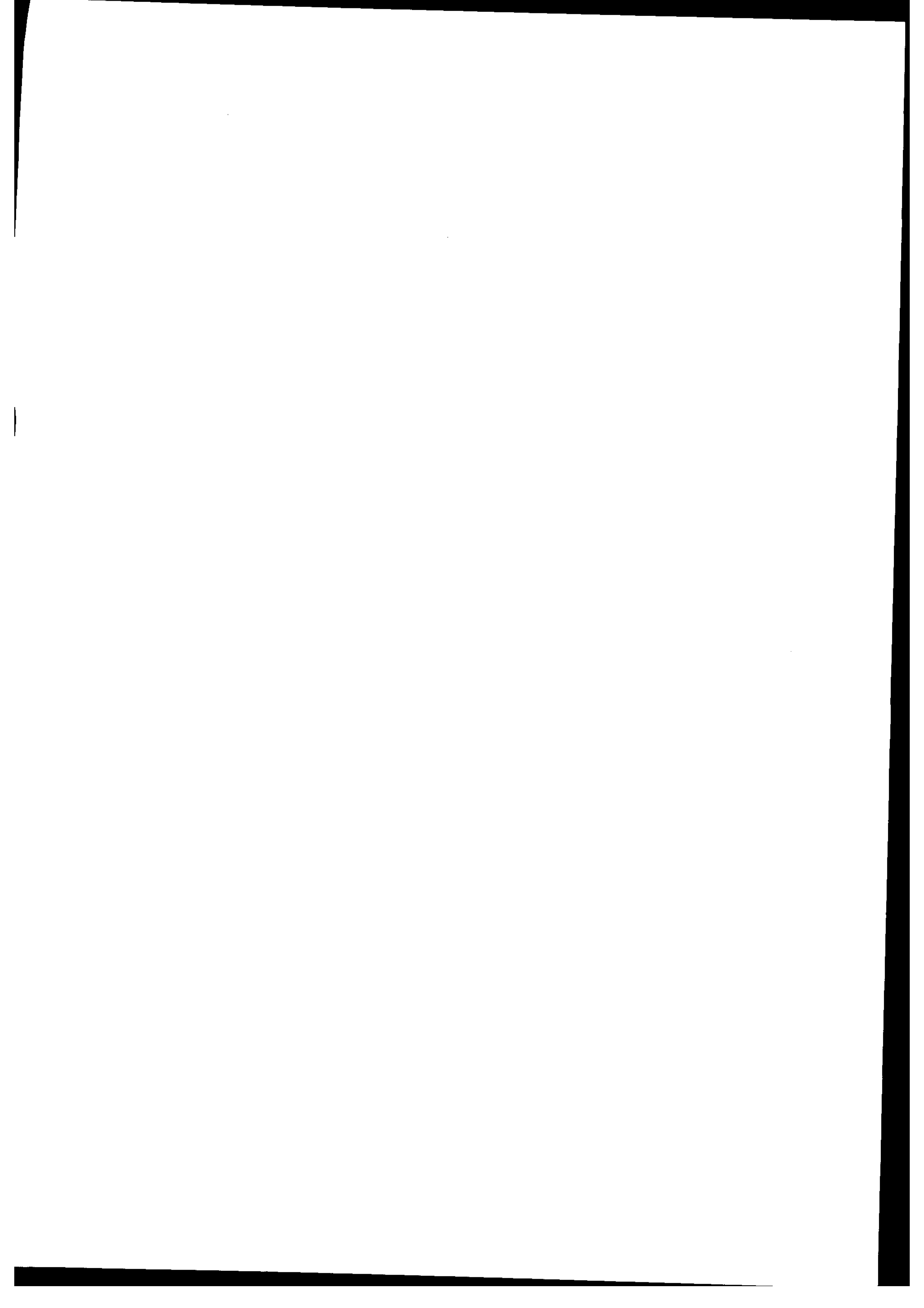
الاســــم : ______________________

زراعة الفيروس فى جنين بيض الدجـــاج

رقـم المعمــل : ______________________

بعد كم يوم من إدخال الفيروس داخل البيضة يتم موت الجنين ؟

بعد فتح البيضة ، ما هو الاختلاف الذى تلاحظه بين البيضة المصابه بالفيروس وغير المصابة ؟

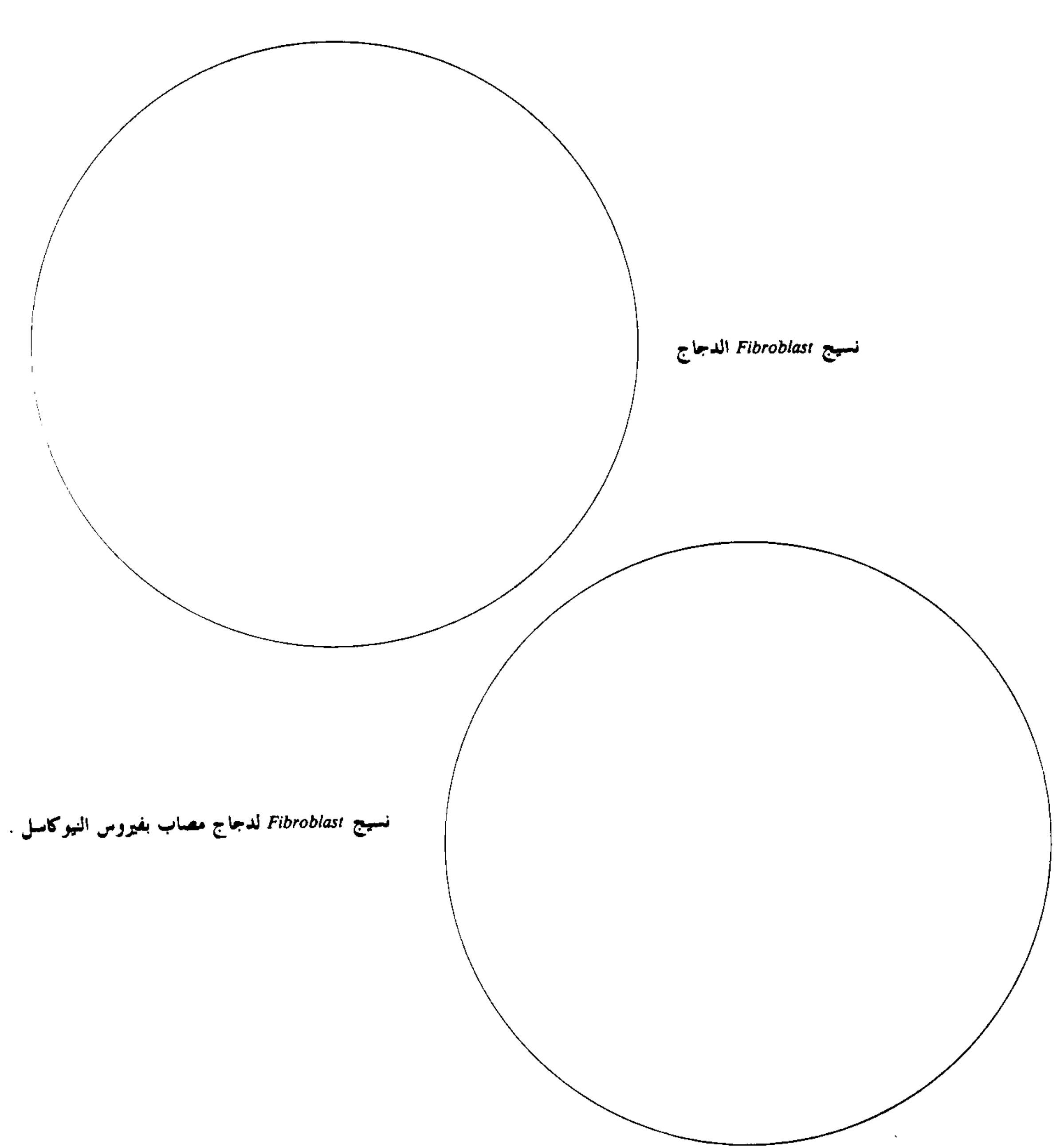


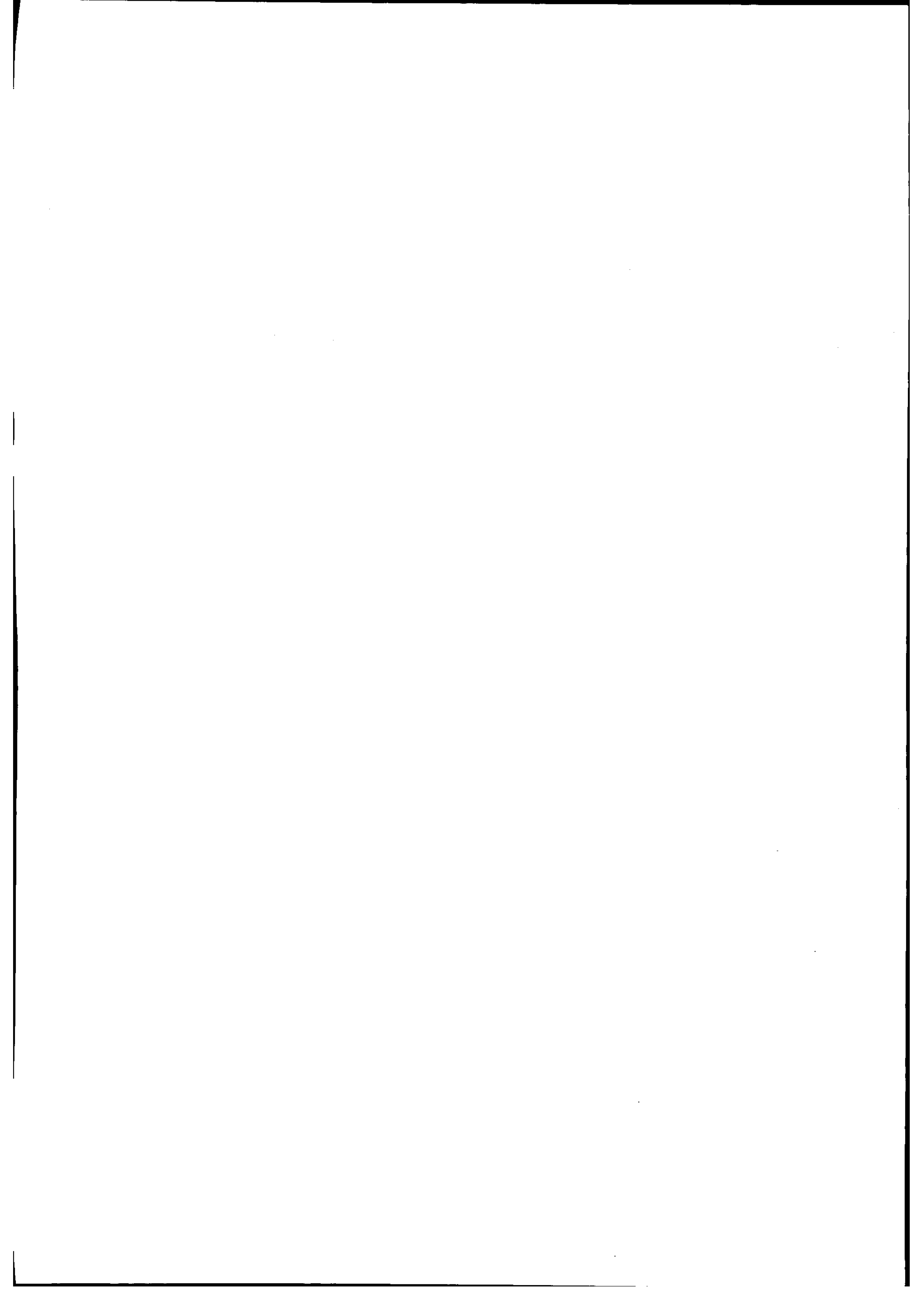
تقـــريـر ٦٠
زراعة الفيروسات فى مزارع الأنسجـــة

الاســــــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

وضح مظهر خلايا المزرعة النسيجية المصبوغة .





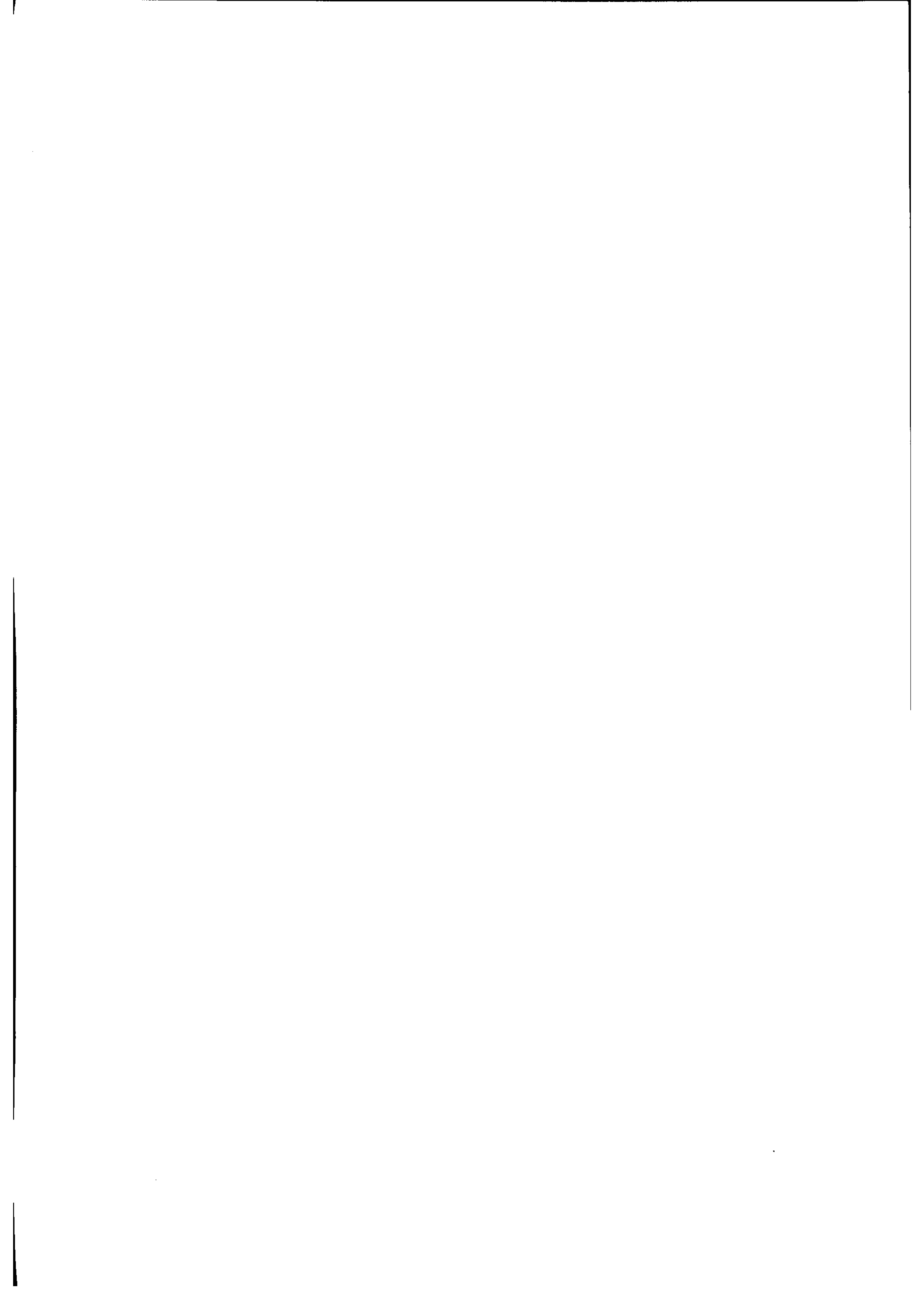
تقـــريـر ٦١

عد الفيروسات : طريقة تجمع الهيـــــم

الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ________________

ما هو معامل تخفيف titer تحضير فيروس النيوكاسل ؟



تقــريـر ٦٢

الاســـــم : ________________

فحص بعض أنواع البروتوزوا

رقــم المعمــل : ________________

أذكر أنواع البروتوزوا التى أمكنك التعرف عليها مبدئيًّا ، واذكر الشواهد والأسباب التى ساعدت فى الوصول إلى هذا التعريف .

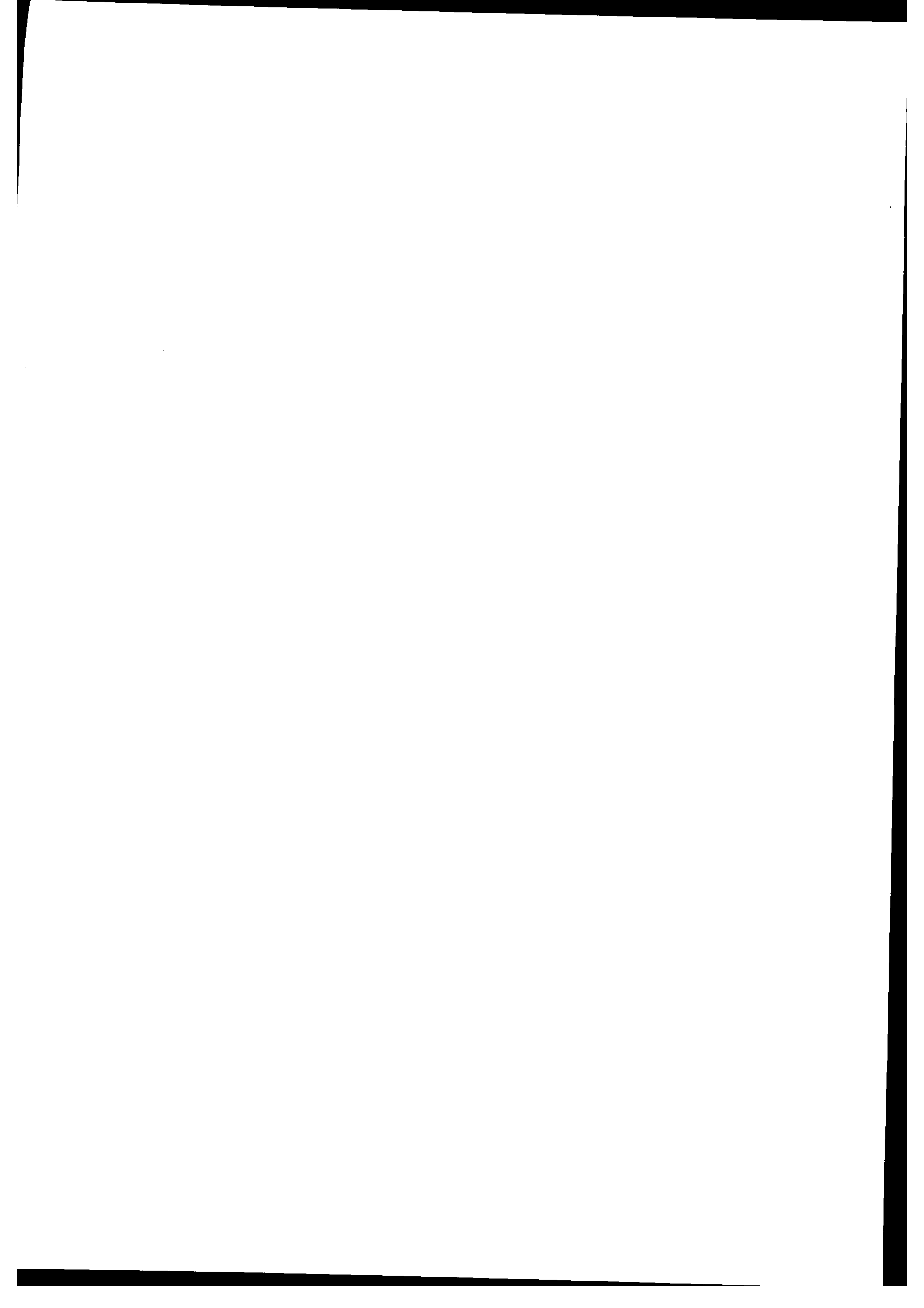
تقــريــر ٦٣

فحص الهائمات النباتية

الاســـــم : ______________________

رقــم المعمــل : ______________________

اذكر المجموعات الرئيسية من الهائمات النباتية التى أمكنك التعرف عليها ، مع توضيح الأسس والأسباب التى بنيت عليها استنتاجاتك .



تقـــريـر ٦٤

الاســـــم : ________________

مورفولوجيا وتكاثر الفطريات

رقـم المعمـل : ________________

ارسم التركيبات الفطرية التى فحصتها مع وضع البيانات على الرسم ؟

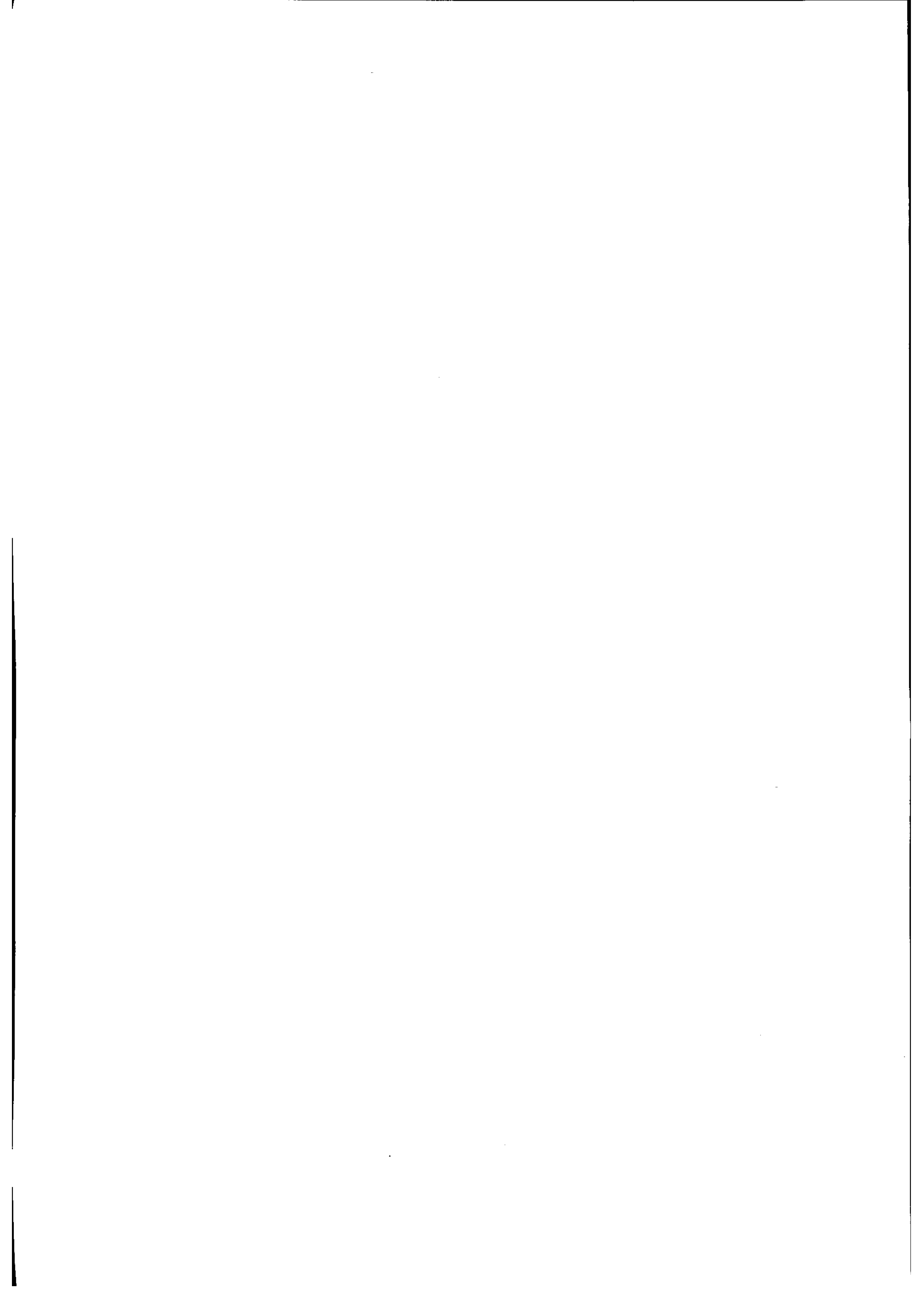
تقـــريـر ٦٥

مورفولوجيا وتكاثر الخمائر

الاســـــم : ______________________

رقـم المعمــل : ______________________

ارسم أنواع الخمائر واكتب البيانات عليها .



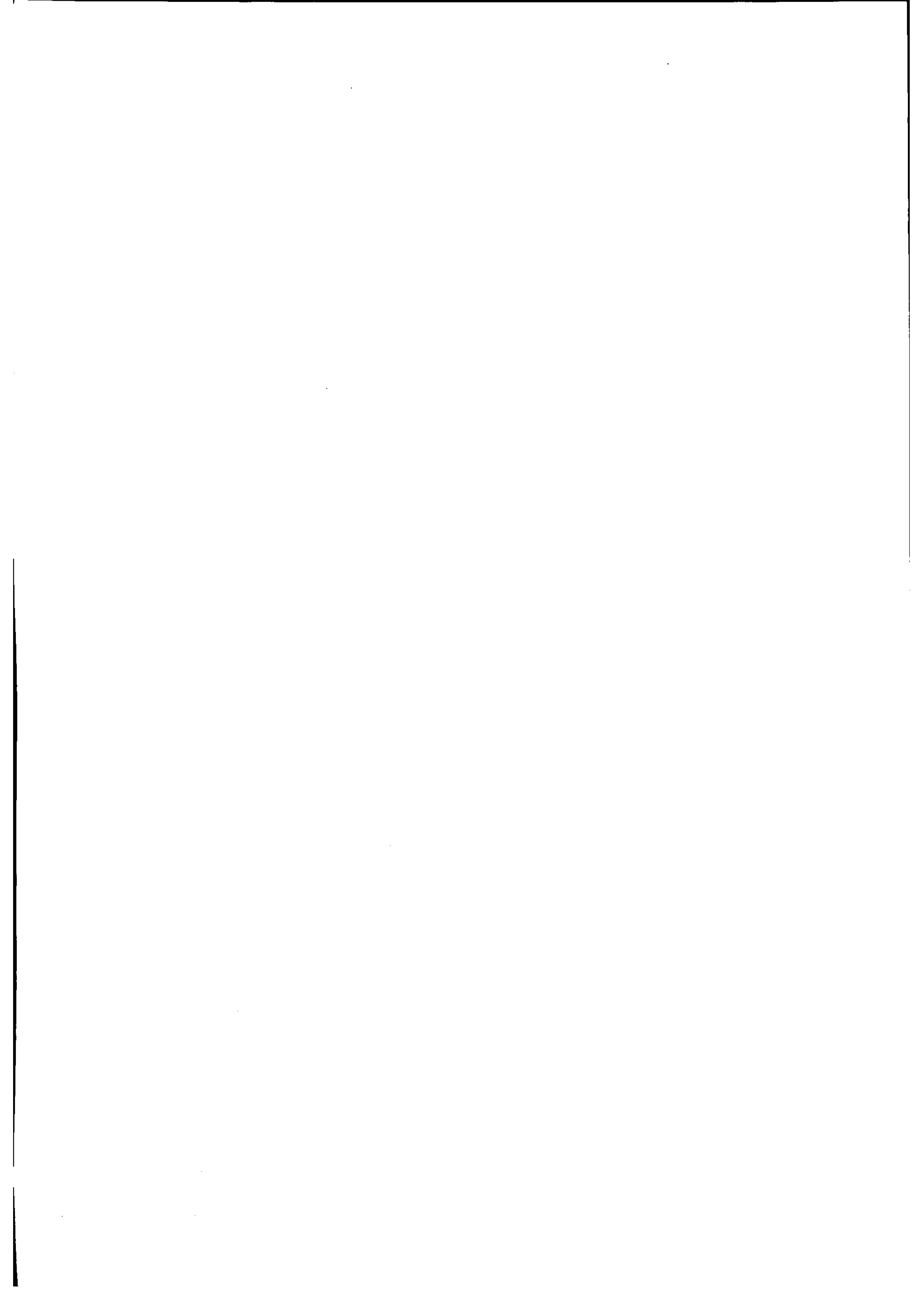
تقـــريـر ٦٦

الاســــم : ________________

تعريف الفطريات

رقــم المعمــل : ________________

ارسم التركيبات التى شاهدتها فى مزارع الشرائح slide cultrues . اعتمد على نتائج الفحص فى عمل تعريف مبدئى لهذه المزارع .



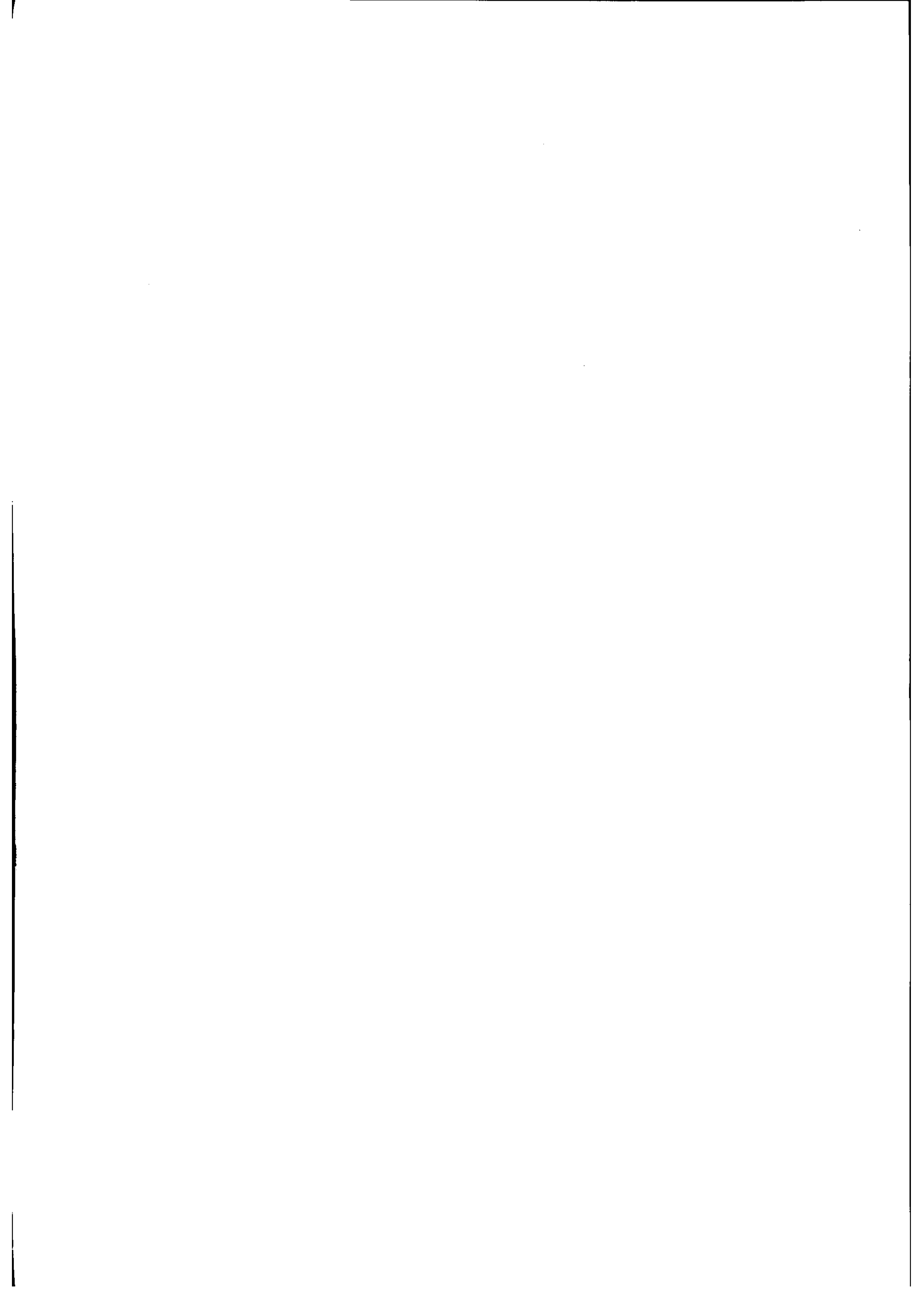
تقــريـر ٦٧

الاســـــم : ________________

الفطريات اللزجة الخلوية

رقــم المعمــل : ________________

ارسم مراحل دورة حياة الفطريات اللزجة التى فحصتها .



تقـــريـر ٦٨

التحليل القياسى للمياه

الاســـــم : ______________________

رقــم المعمــل : ______________________

اكتب تقريرا عن نتائج تحليلك ، موضحا نتائج كل مرحلة واستنتاجك النهائى لها . استخدم الجدول الموجود فى ظهر هذه الصفحة لتقدير العدد الأكثر احتمالا (most probable number, MPN) لبكتيريا القولون لكل ١٠٠/ مل من العينة .

جدول العدد التقريبى لكل ١٠٠ مل من العينة
باستخدام ثلاث أنابيب لكل تخفيف

عدد الأنابيب الإيجابية لكل تخفيف			العدد التقريبى MPN per 100 ml	عدد الأنابيب الإيجابية لكل تخفيف			العدد التقريبى MPN per 100 ml
10 ml	*1 ml*	*0.1 ml*		*10 ml*	*1 ml*	*0.1 ml*	
0	0	0		2	0	0	9.1
0	1	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29				

تقــرير ٦٩

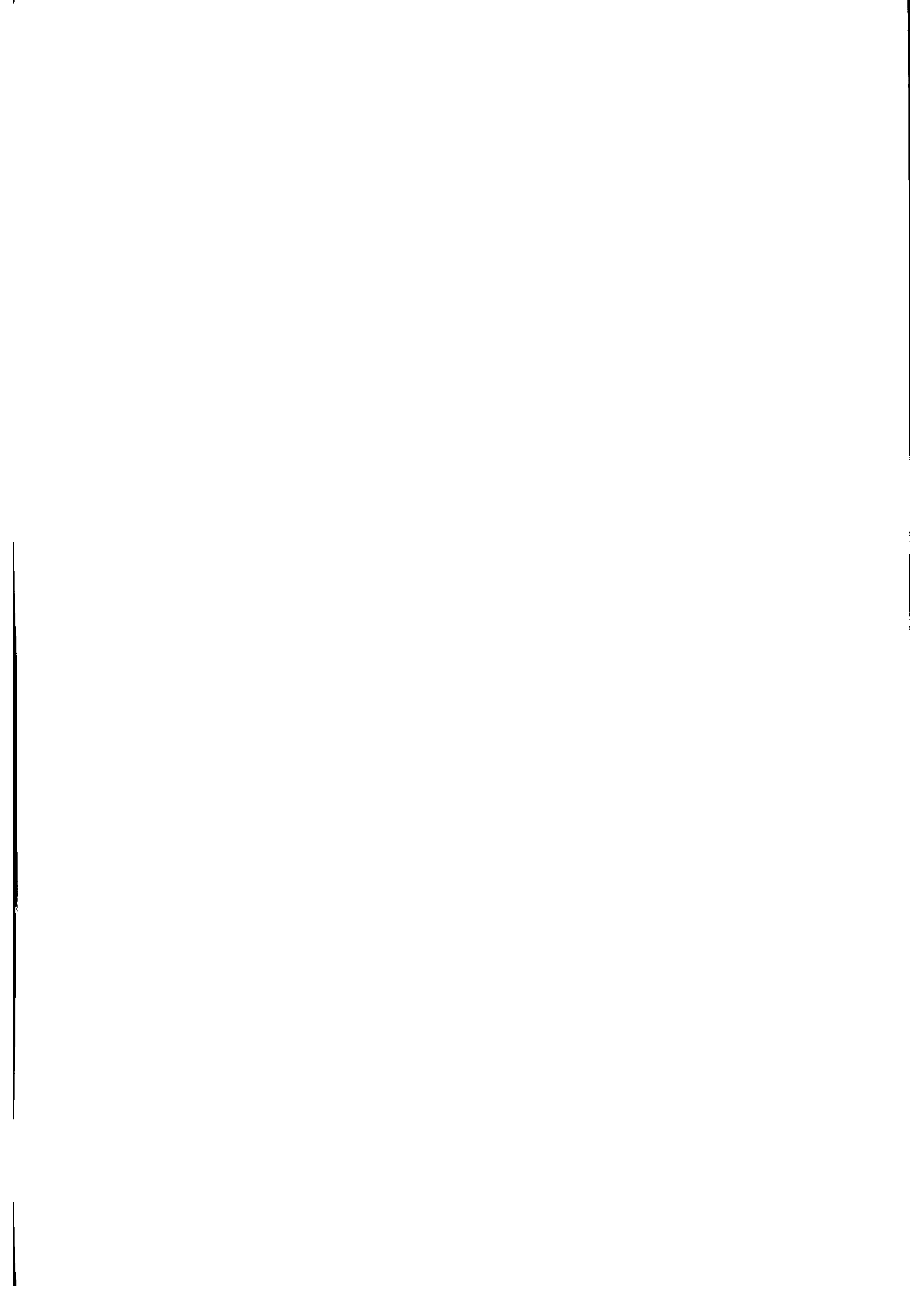
الاســــم : ____________________

طريقة المرشحات الغشائية لتحليل المياه

رقـم المعمـل : ____________________

- ما هو العدد الكلى لبكتيريا القولون فى عينة المياه ؟
- ما هو عدد بكتيريا القولون البرازية فى عينة المياه ؟
- ما هو عدد البكتيريا السبحية البرازية فى عينة المياه ؟

- هل يمكنك على أساس نسبة بكتيريا القولون البرازية / البكتيريا السبحية البرازية (FC/FS ratio) ، استنتاج نوع التلوث هل هو من أصل إنسانى أم حيوانى ؟



تقـــريـر ٦٩

طريقة المرشحات الغشائية لتحليل الهـــواء

الاســــم : ————————

رقـم المعمـل : ————————

- ما هو العدد البكتيريا فى عينة الهواء التى فحصتها ؟
- ما هى أعداد الخمائر والفطريات فى عينة الهواء ؟
- وضح كيف أمكنك حساب النتائج .

تقــريـر ٧٠

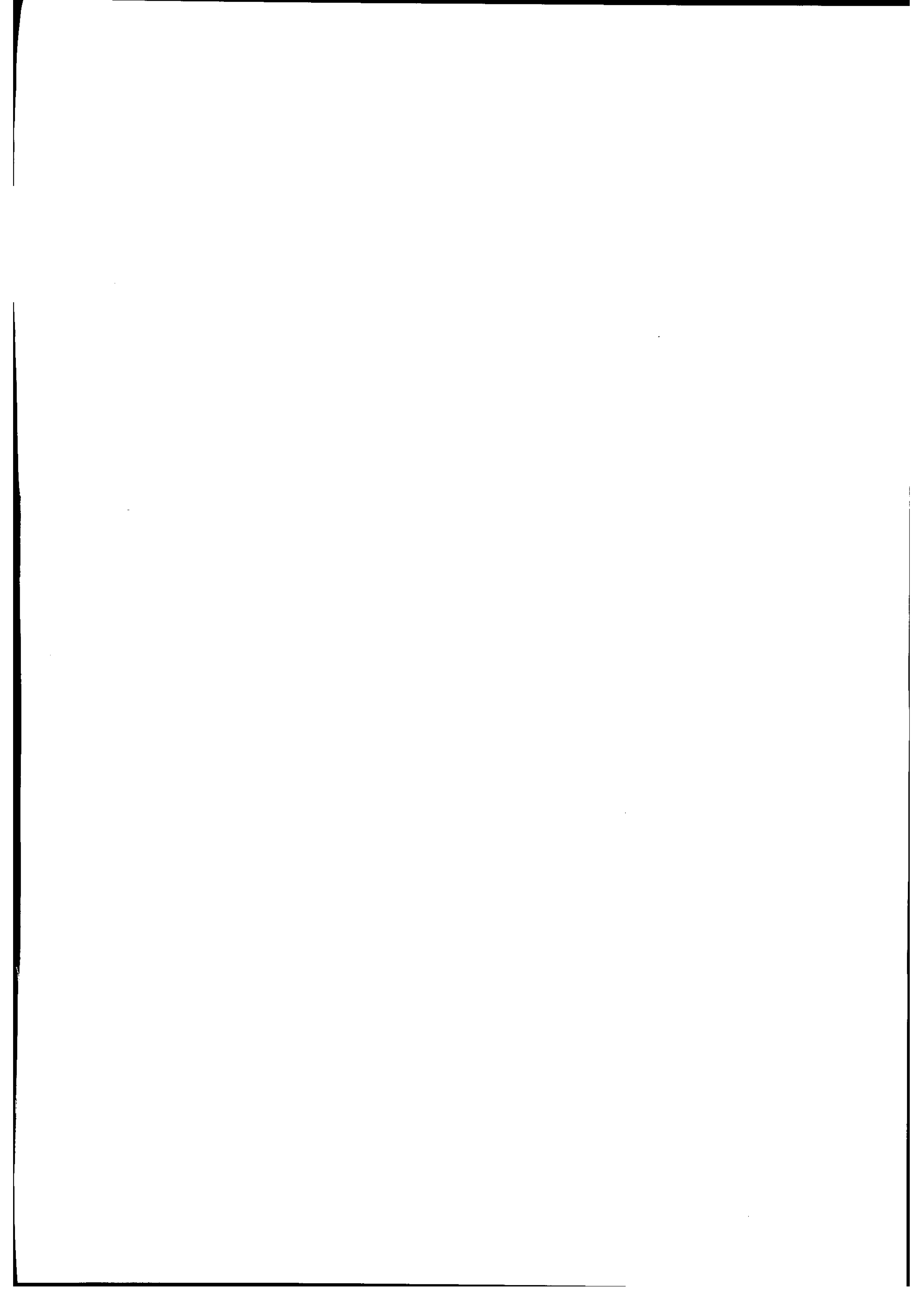
الاســـم : ____________

رقـم المعمـل : ____________

التقديرات الكمية للبكتيريا فى اللبن

الحليب : الخام والمبستر

نوع العينة	التخفيف المستخدم فى العد	عدد المستعمرات	عدد البكتيريا لكل ملليلتر حليب
لبن حليب خام على بيئة الديزوكسيكولات			
لبن حليب خام على بيئة العد الكلى			
حليب مبستر على بيئة الديزوكسيكولات			
حليب مبستر على بيئة العد الكلى			



تقـــرير ٧١

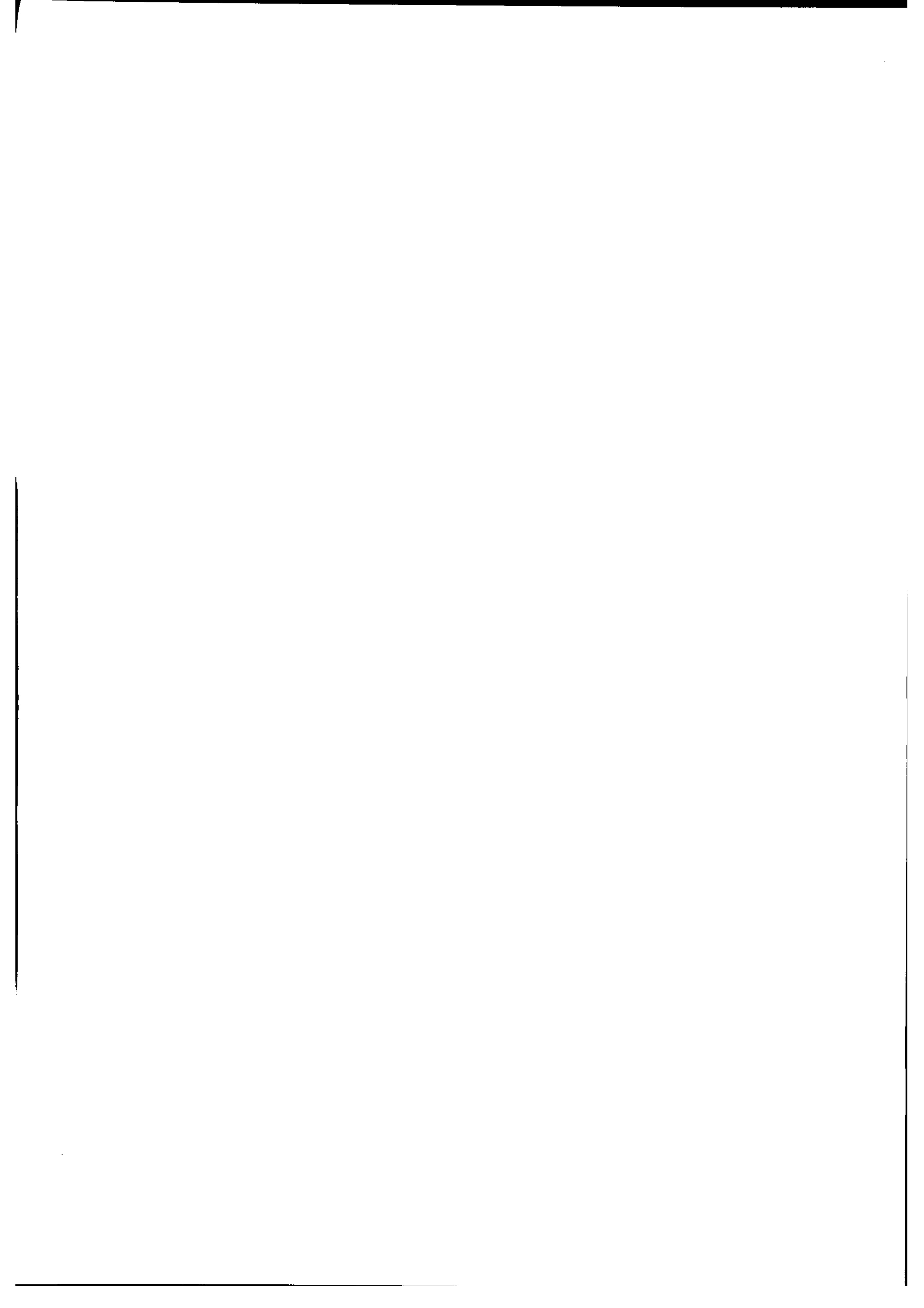
العد الميكروسكوبى المباشر للبكتيريا فى اللبن الحليب

الاســـــم : ___________________

رقـم المعمـل : ___________________

ضع النتائج فى هذا الجدول ، ووضح طريقة الحساب أسفله

نـوع البيـئة	عدد الحقول الميكروسكوبية المفحوصة	عدد البكتيريا التى تم عـدها	عدد البكتيريا لكل ملليلتر حليـب
حليب عالى الجودة			
حليب منخفض الجودة			



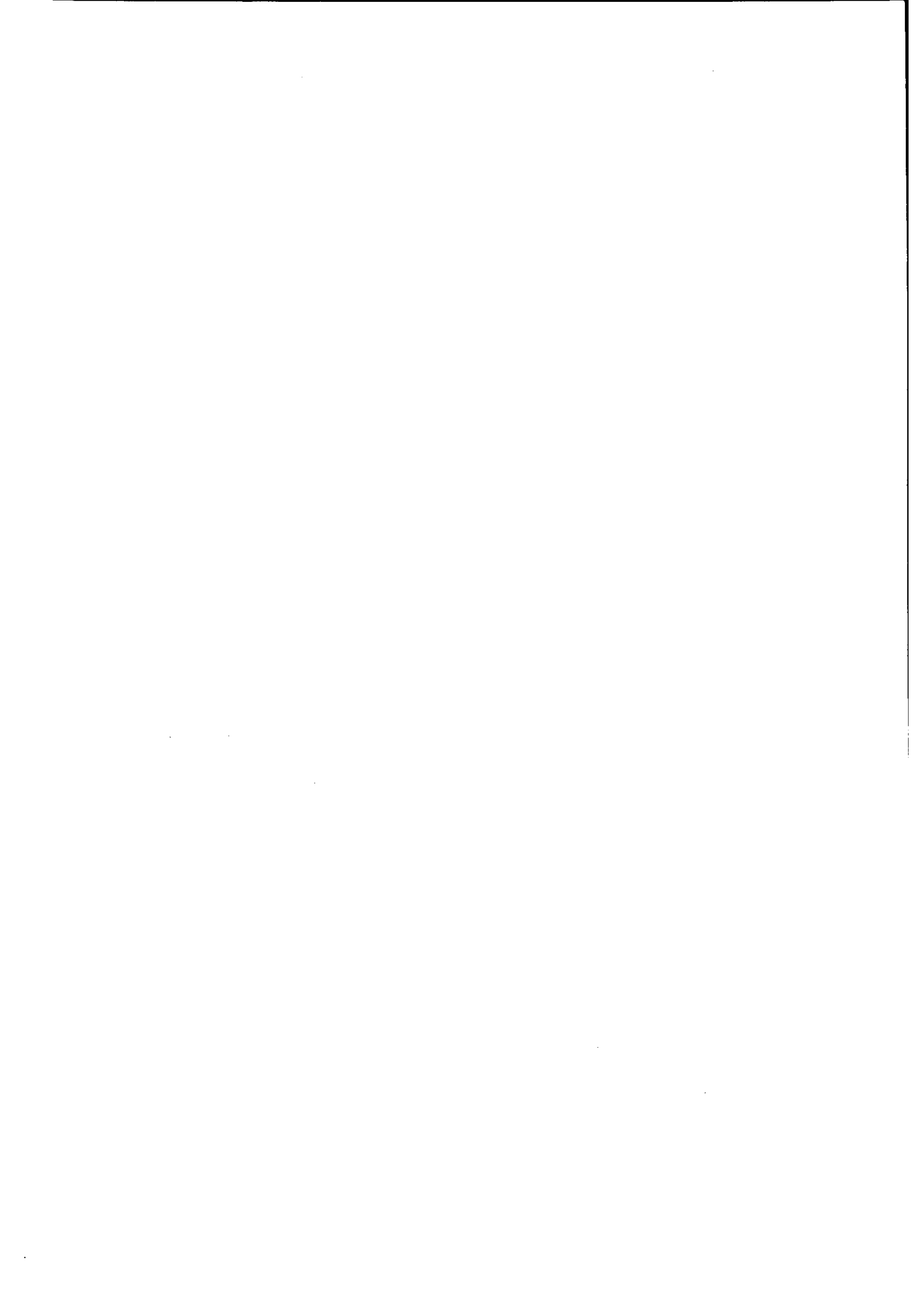
تقــريــر ٧٢

الأغذية المتخمرة : الجبن

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

نوع الجبن	مواصفات الجبن	عدد الميكروبات/ جرام	صبغة جرام وأشكال الميكروبات
شـــيدر **Chedder**			
زرقـاء **Blue**			
كـــوتج **Cottage**			
روكفــورت **Roquefort**			
كمـمـبرت **Camembert**			



تقــريـر ٧٣

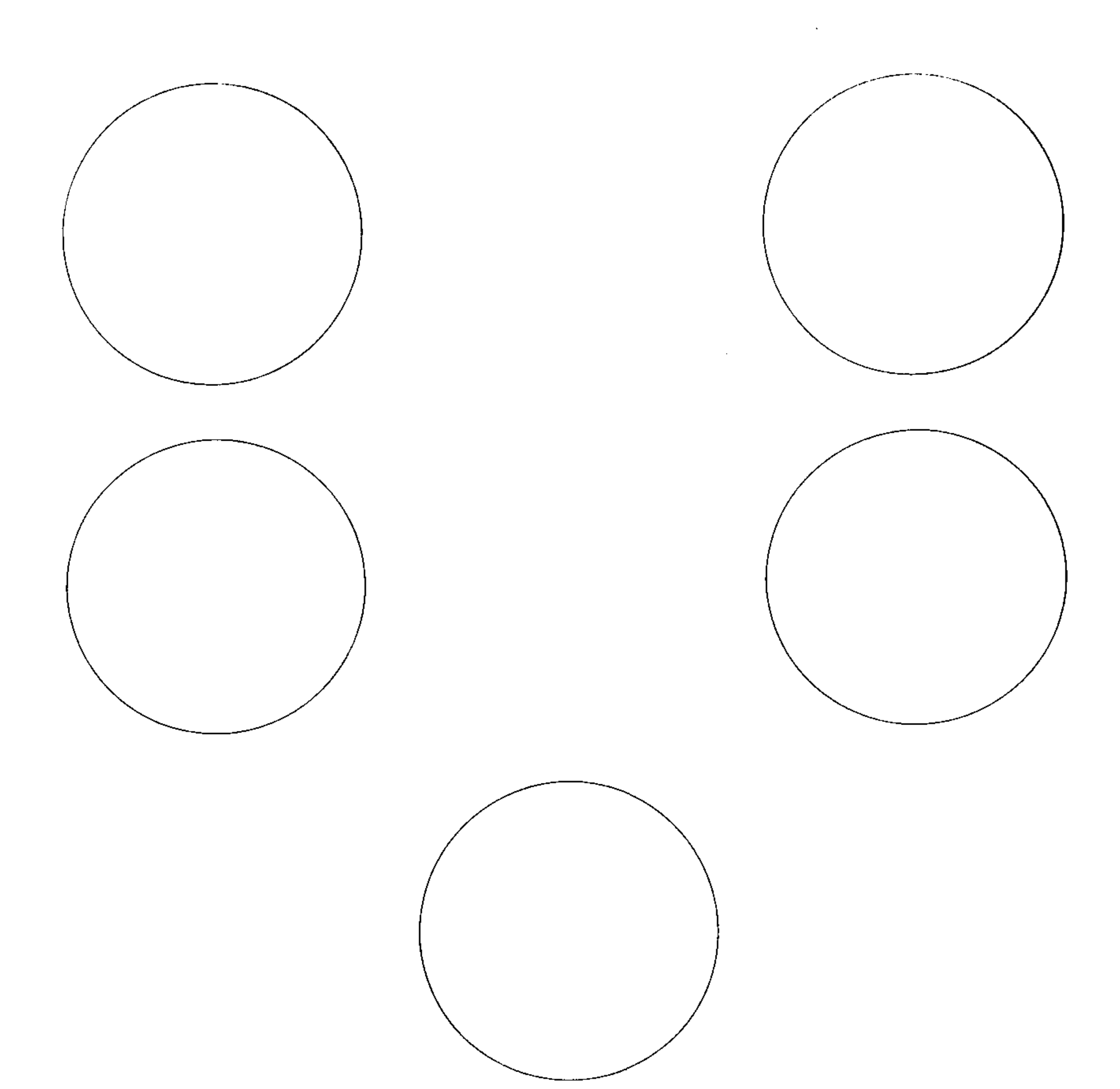
المحتوى الميكروبى فى الأراضى

الاســـم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

نوع العينة	التخفيف الذى تم عده	عدد المستعمرات	العدد / جم تربة
تربة حدائق خصبة			
تربة رملية صفراء			

ارسم أشكال البكتيريا الموجودة فى خمس مستعمرات مختلفة وحاول تعريفها .





تقــريـر ٧٤

دورة النيتروجين

الاســـم : ________________

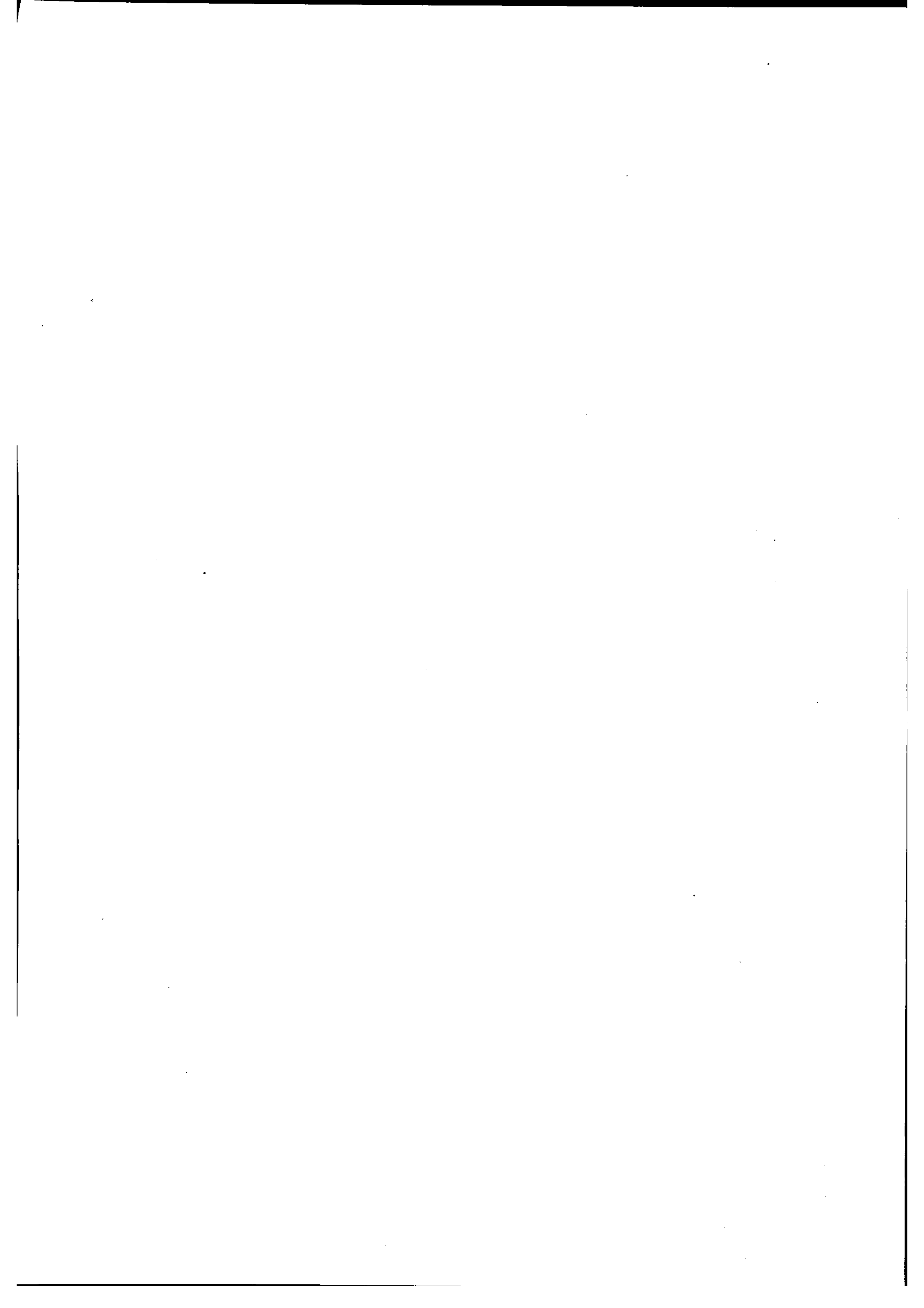
رقــم المعمــل : ________________

التأزت : تكوين النتريت

الوقت	NH_3	NO_2	الشكل المورفولوجى ونتيجة صبغة جرام
أسبوع			
أسبوعين			
ثلاث أسابيع			

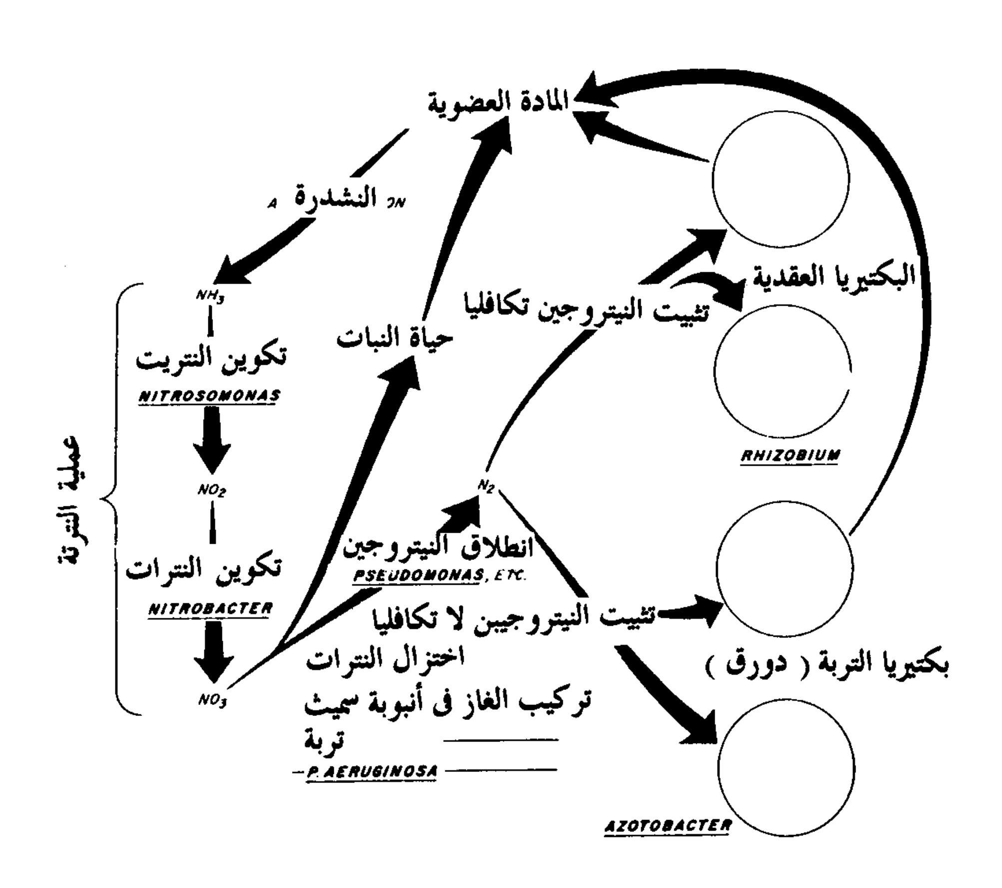
التأزت : تكوين النترات

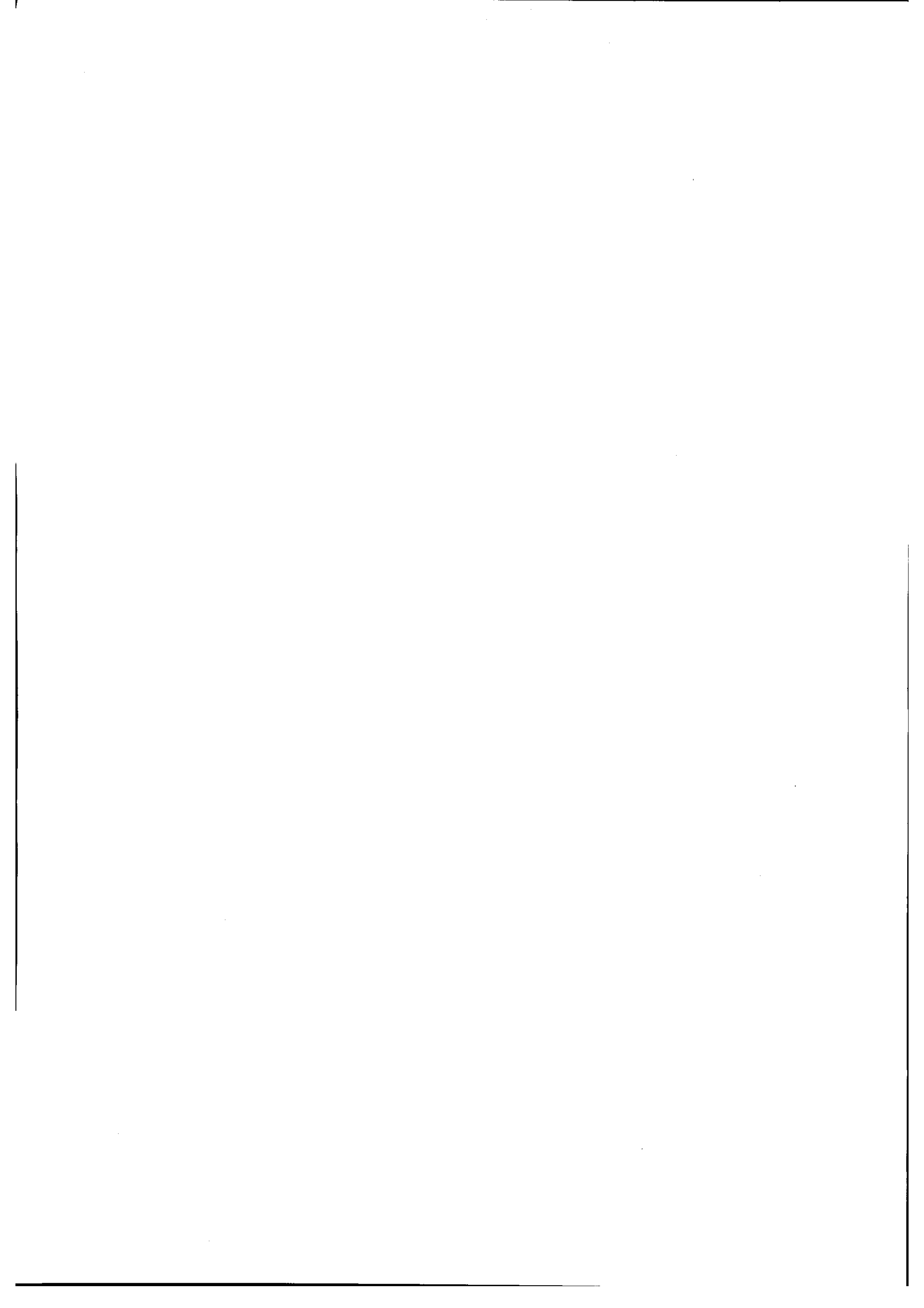
الوقت	NO_2	NO_3	الشكل المورفولوجى ونتيجة صبغة جرام
أسبوع			
أسبوعين			
ثلاث أسابيع			



النشـــدرة

نـــوع المـــزرعـة	NH_3
تربة	
Bacillus cereus	
Pseudomonas fluorescens	
Proteus vulgaris	





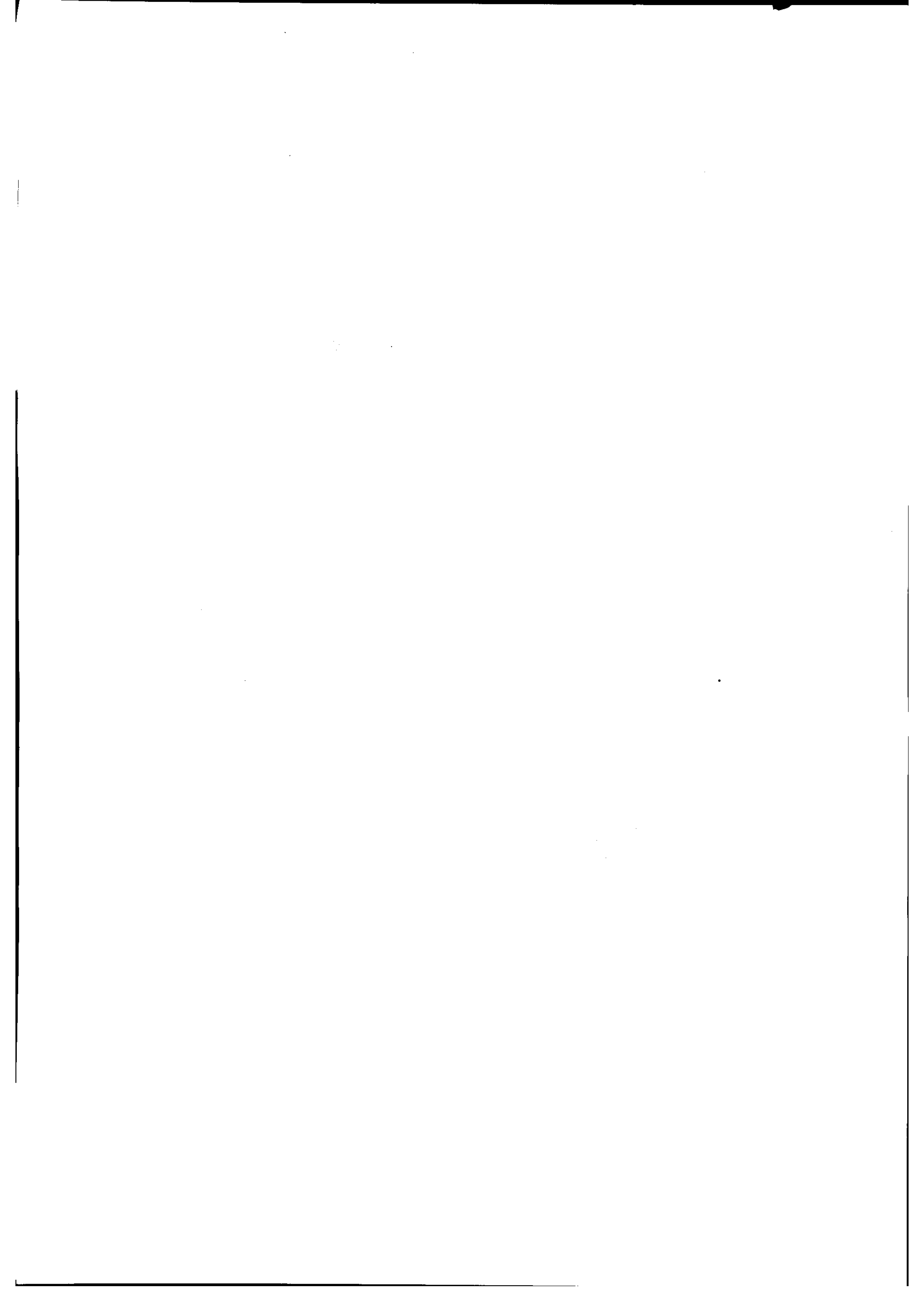
تقـــريـر ٧٥

الفلورا (المجموعة الميكروبية) الطبيعية للحلق

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

وصف المستعمرات ونوع التفاعل عـلى آجـار الـدم	صبغـــة جـــرام	أشـــكال الميكـــروبـات



تقـــريـر ٧٦

تعريف البكتيريا العنقودية المرضية

الاســـــم : ______________________

رقـم المعمـل : ______________________

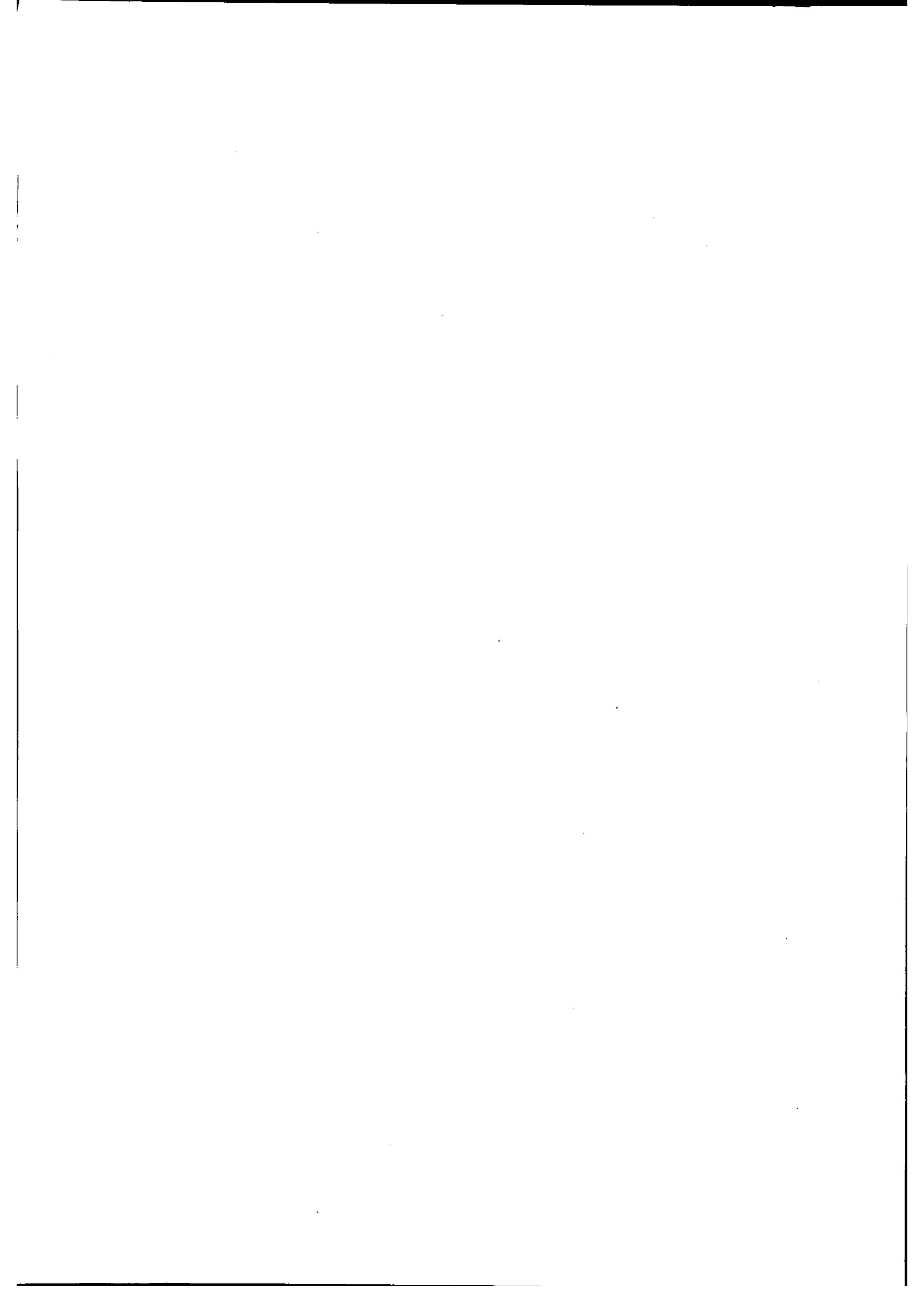
اختبار الكواجيولاز

المزرعة المختبرة	تفاعل الكواجيولاز	الوقـــت
المـــزرعة A		
المـــزرعة B		

اختبار الثبات الحرارى لإنزيم DNase

المزرعة المختبرة	وجود DNase الثابت حراريا
المـــزرعة A	
المـــزرعة B	

أى من المزرعتين A ، B يعتبر بكتيريا مرضية ؟



تقــريــر ٧٧

الاســـــم : ____________________

رقــم المعمــل : ____________________

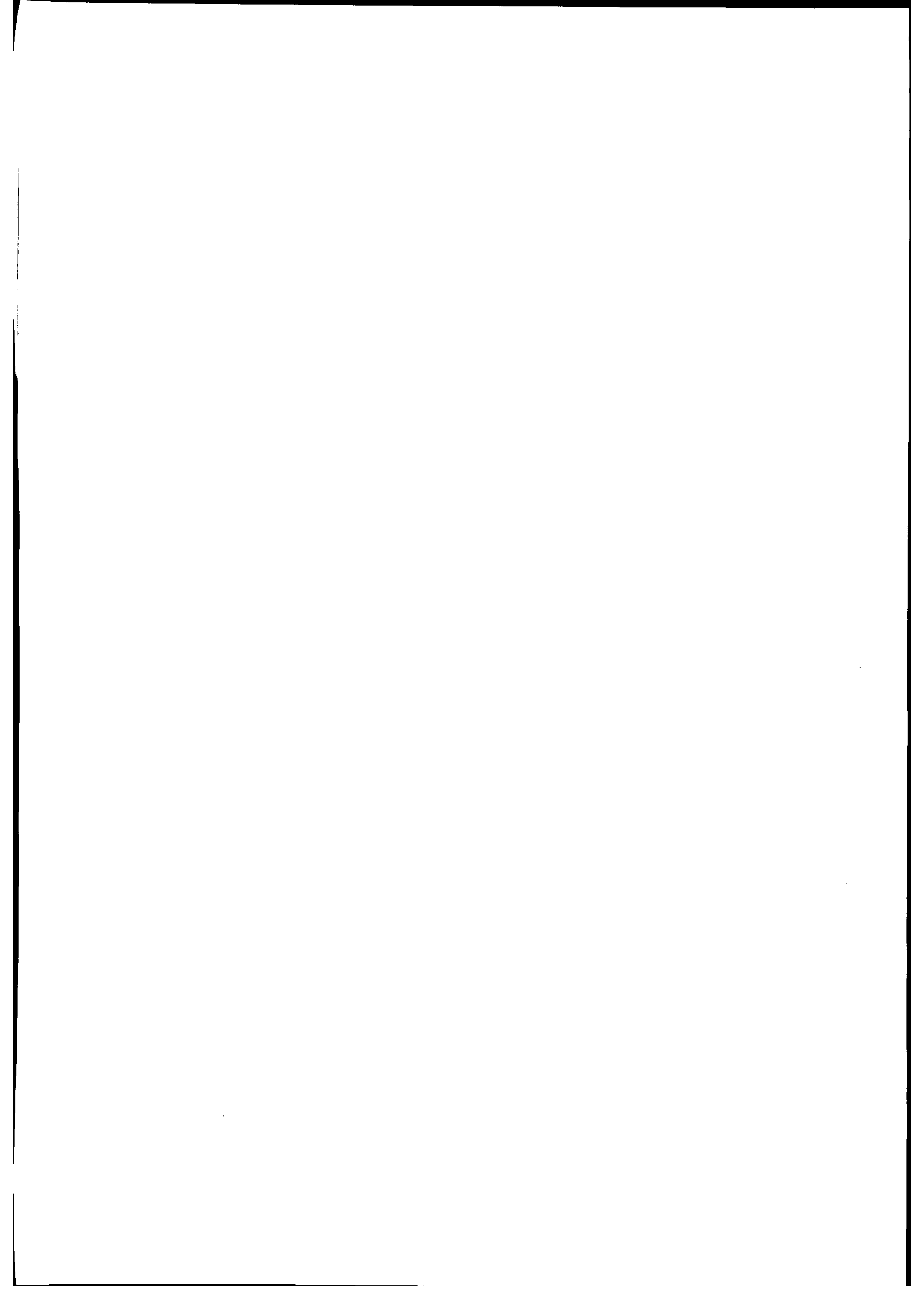
اختبارات أقراص الحساسية للمضادات الحيوية المستخدمة علاجيا :
طريقة كيربى ــ باور

الميكروب : ____________________

المضــــاد الحيــــوى	قطـــر منطقـــة التضـــاد	الحســـاسيـــة حساس ــ متوسط ــ مقاوم

الميكروب : ____________________

المضـــــــاد	قطـــر منطقـــة التضـــاد	الحســـاسيـــة حساس ــ متوسط ــ مقاوم



تقـــريـر ٧٨

التعرف على افتراضات كوخ

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

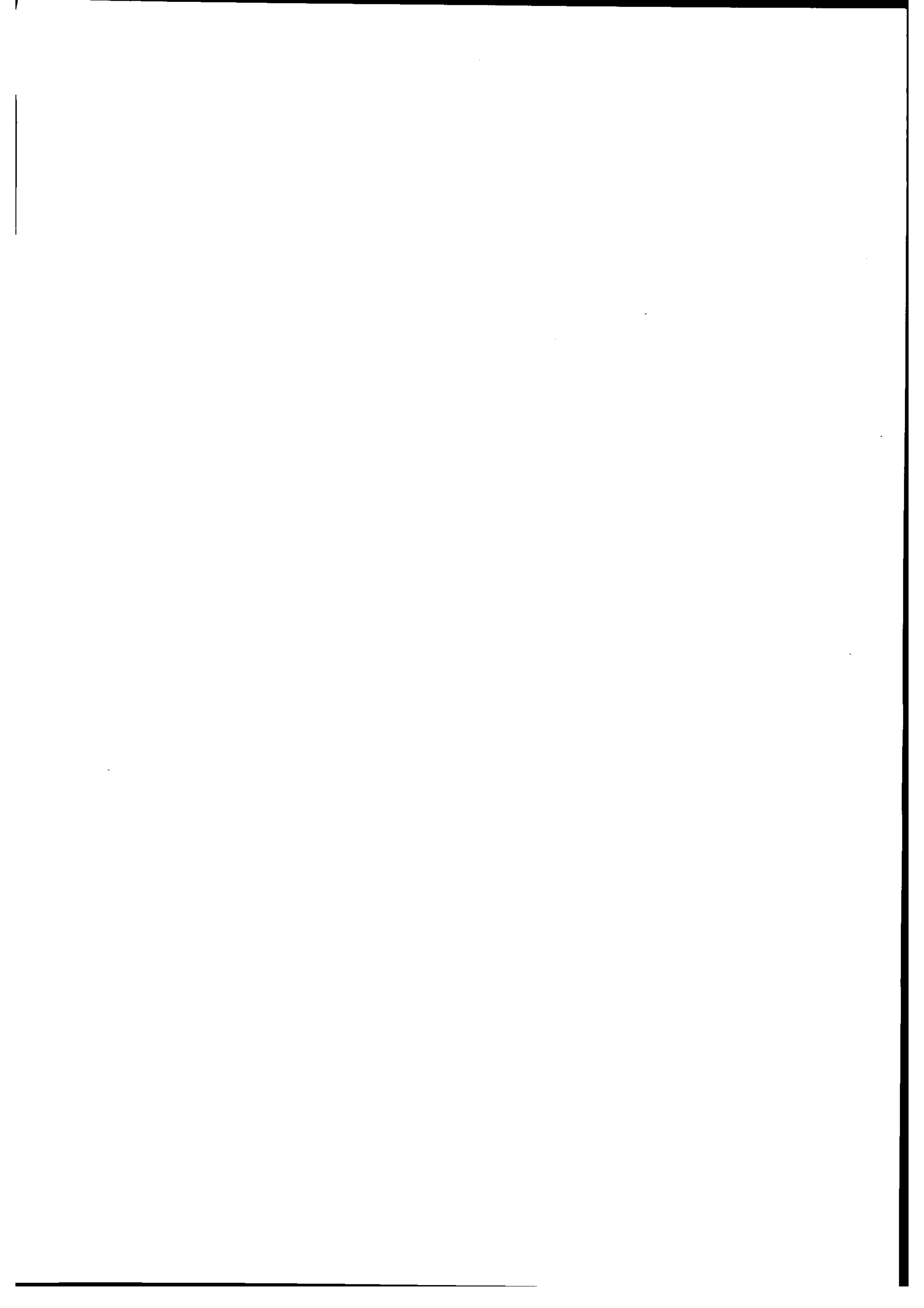
ما هو السمك الذى مات ؟

ما هو سبب موت السمك ؟

فى الجدول التالى .. اعمل مقارنة لصفات المزرعة التى تم عزلها من السمكة الأصلية الميتة مع تلك التى عزلت من السمكة التى لقحتها بنفسك .

الصفـــــات	العزلة الأصلية	العزلة النهائية
الشكل المورفولوجى		
نتيجة صبغة جرام		
تفاعل الأكسيديز		
تحليل النشا		
الحساسية للمضادات الحيوية*		
بنسلين		
نوفوبيوسين		
تتراسيكلين		
استربتوميسين		

* سجل قطر منطقة التضاد

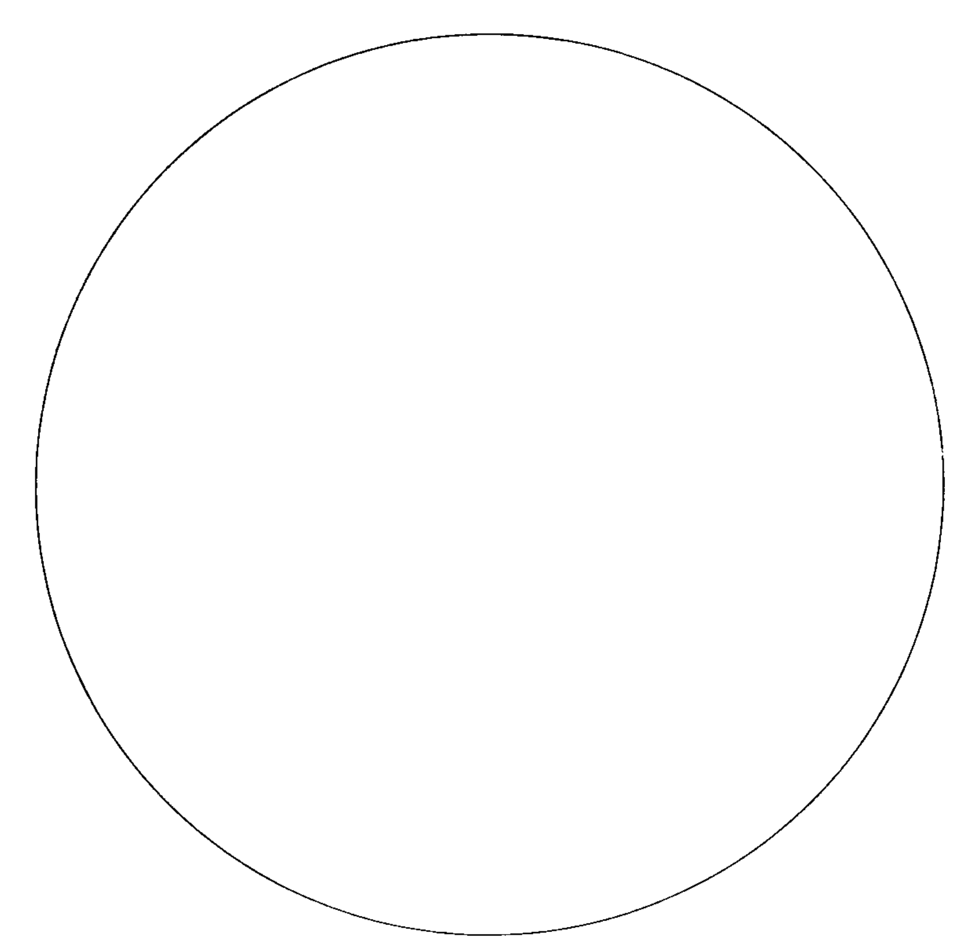


تقــريــر ٧٩
الالتقـــام

الاســـــم : ______________

رقــم المعمــل : ______________

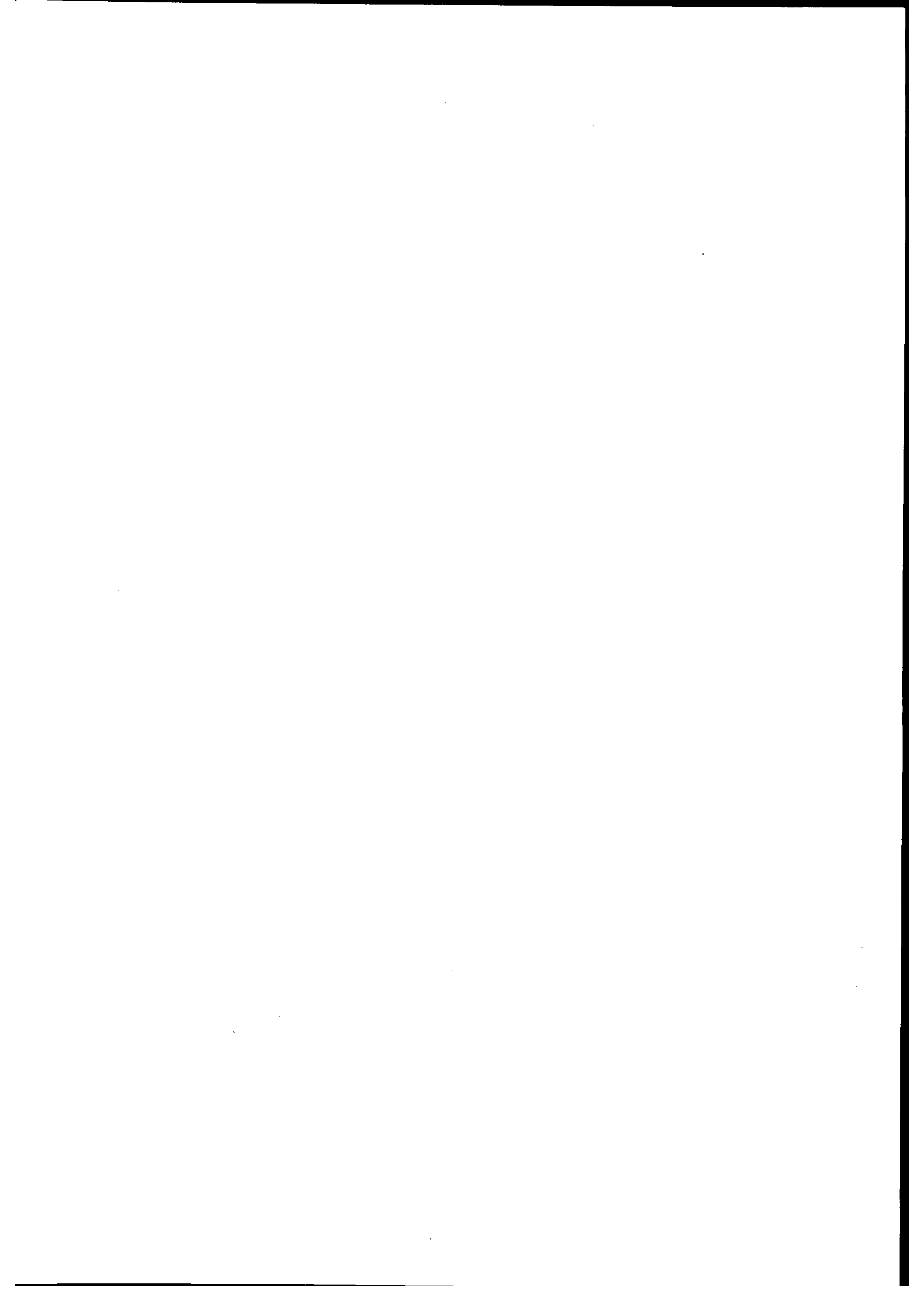
وضح أشكال الخلايا اللاقمة التى فحصتها ، وموضع بكتيريا *Staphylococcus aureus* فى التحضير .



ما هو مقياس الالتقام لـ :

عينة أ ؟

عينة ب ؟



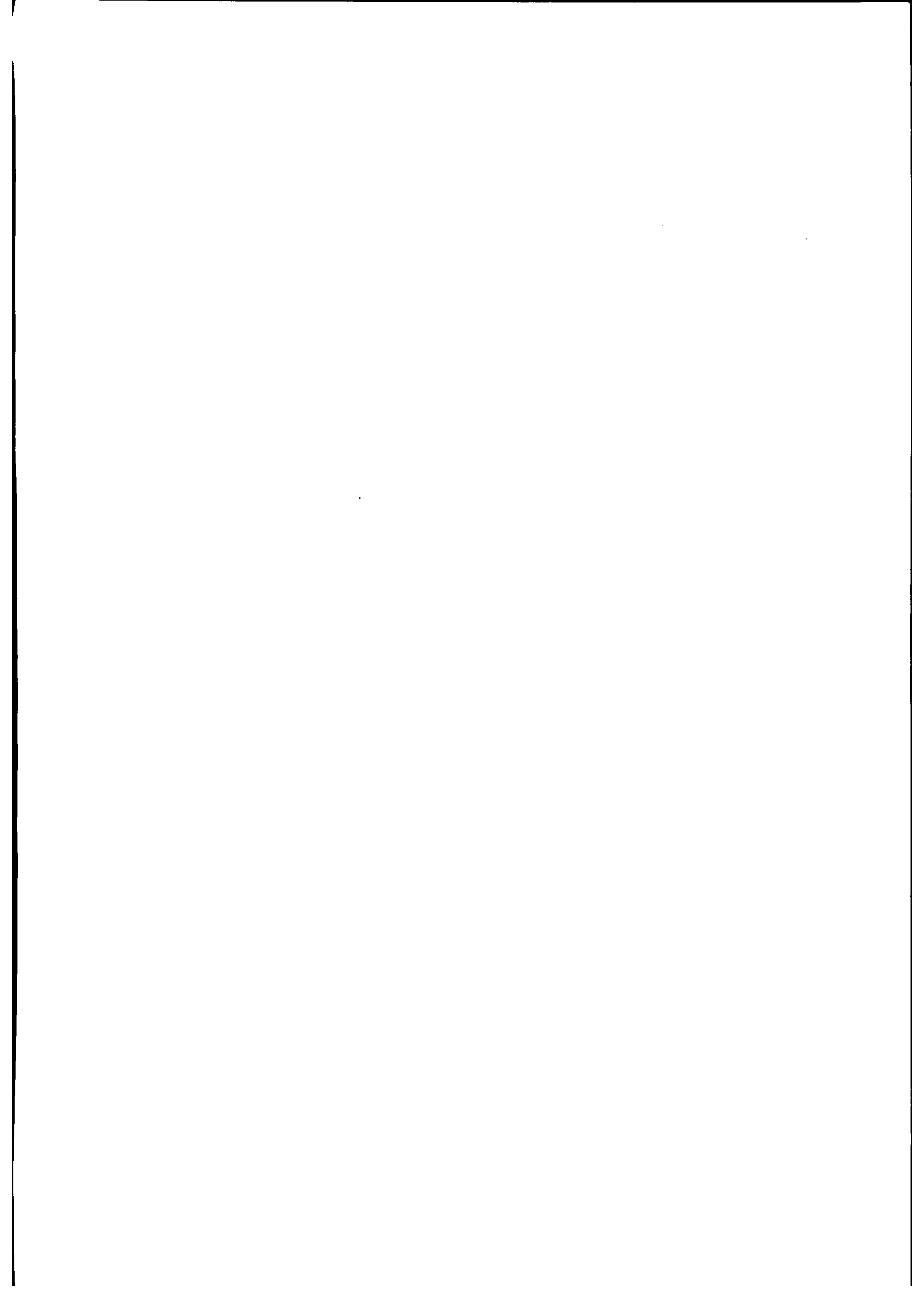
تقـــريـر ٨٠

اختبار التجمع على الشريحة

الاســـــم : ______________

رقـم المعمـل : ______________

أى نوع من السيرم أخذ من دجاج مريض ؟

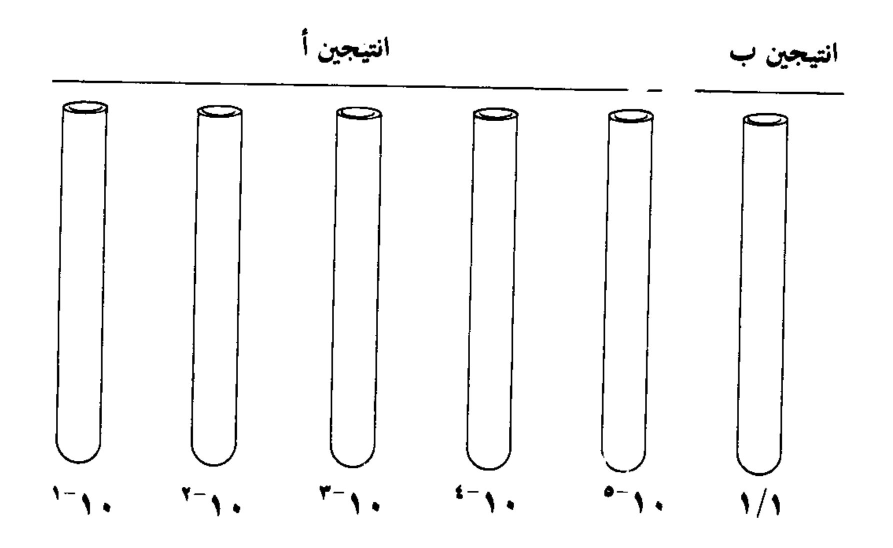


تقــريـر ٨١
اختبار الترسيب

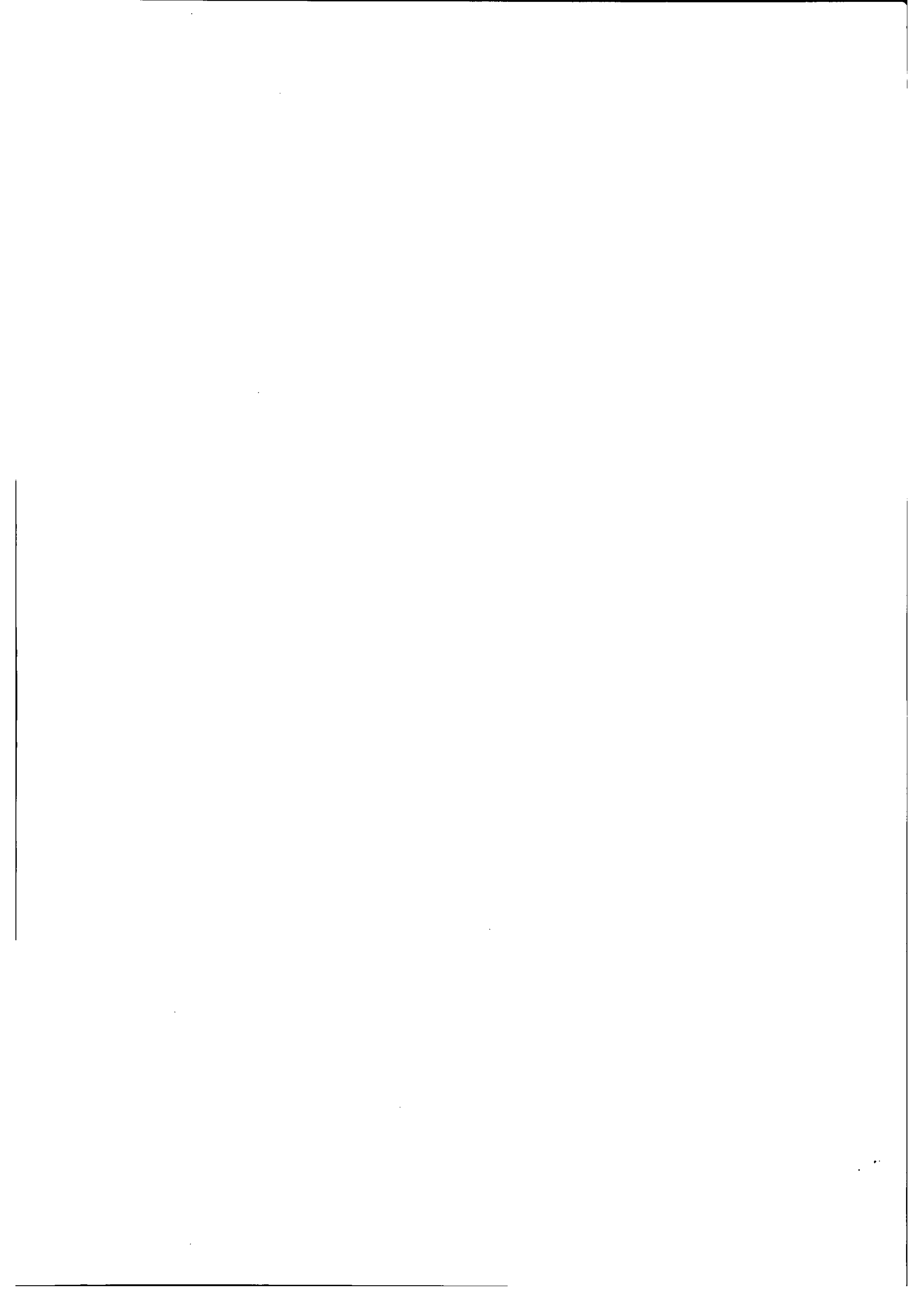
الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

ارسم فى الأنابيب التالية ملاحظاتك بعد ٣٠ دقيقة .



معامل تخفيف انتيجين أ هو : ________________



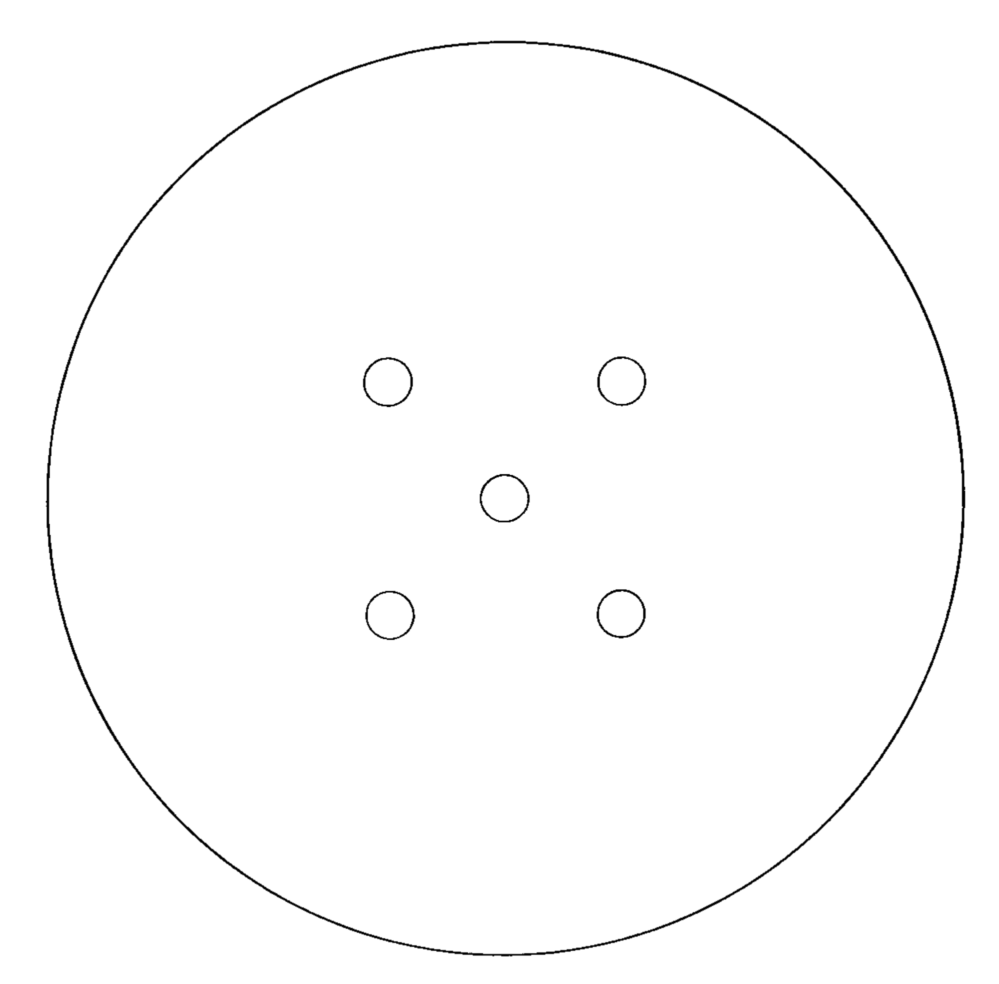
تقـــرير ٨٢

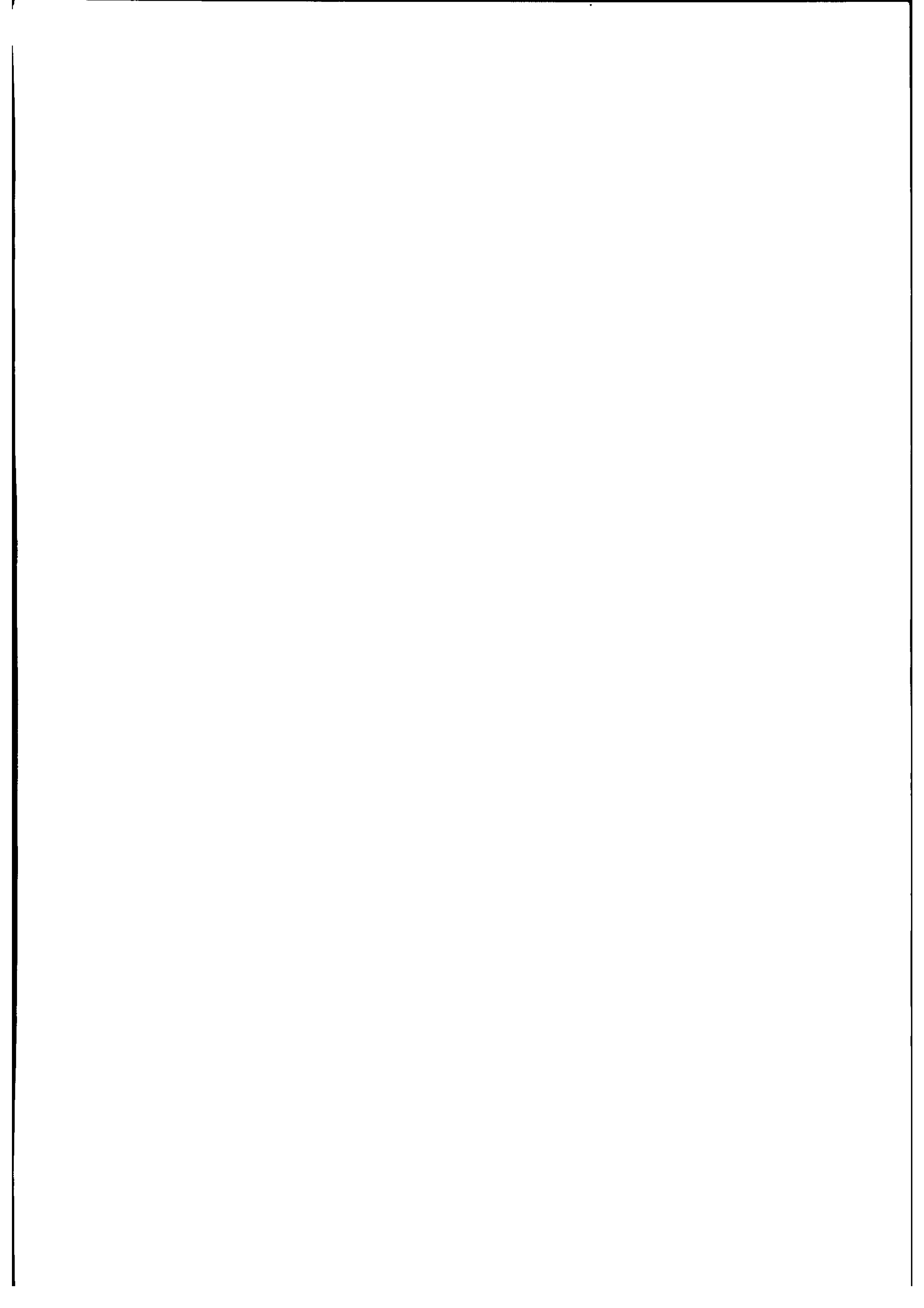
الاســـــم : ________________

الانتشار المناعى : طبق اوكترلونى

رقـم المعمـل : ________________

ارسم فيما يلى خطوط الترسيب التى تكونت فى طبقك . وضح نوع التفاعل (تماثل ــ تماثل جزئى ــ عدم تماثل) .





تقــريـر ٨٣

الاســـم : ـــــــــــــــــــــــ

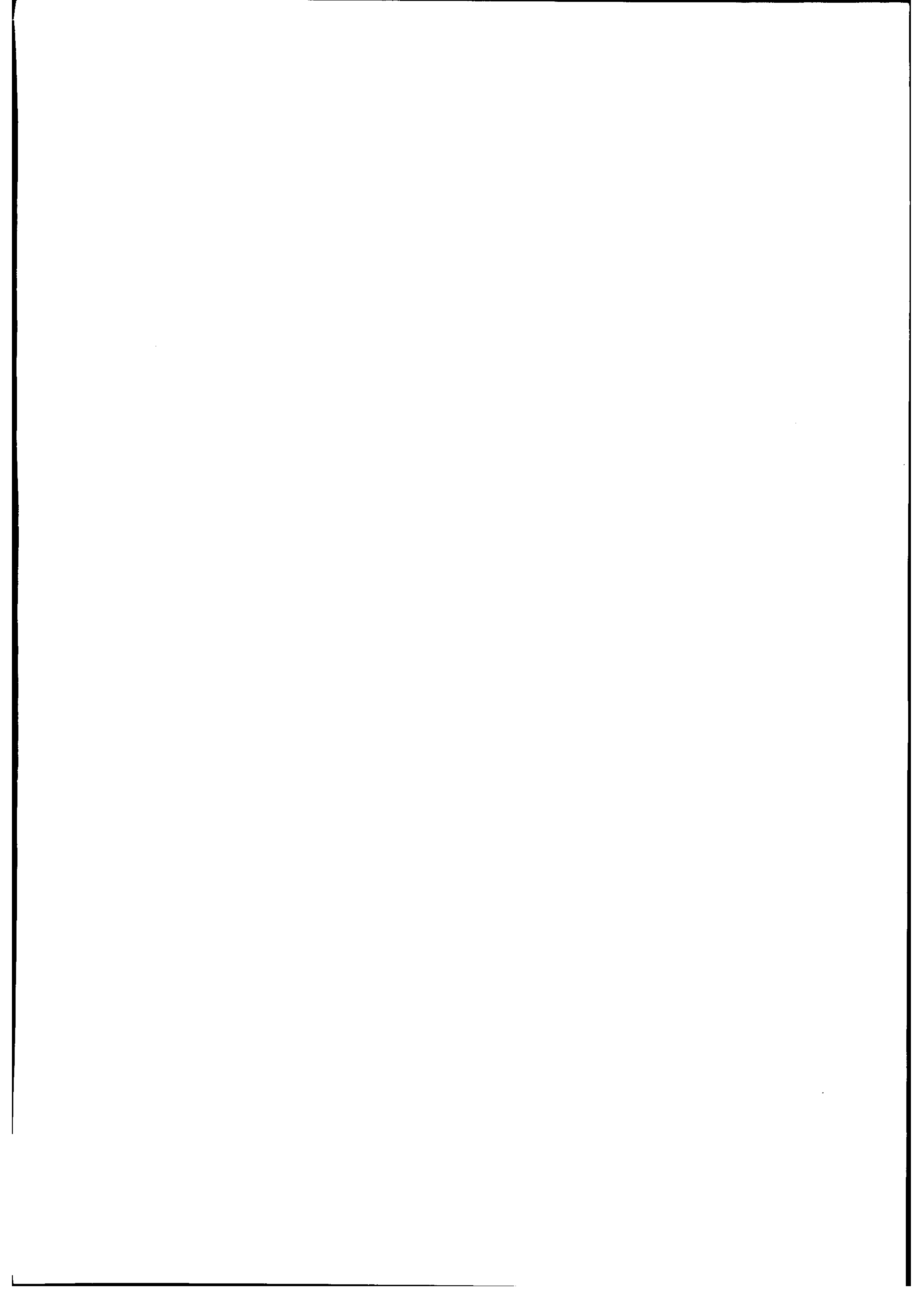
اختبار تثبيت العامل المكمل

رقـم المعمـل : ـــــــــــــــــــــــ

سجل النتائج فى الجدول التالى . ضع صفرًا فى حالة عدم تثبيت العامل المكمل (تحلل تام) ، ++++ للتثبيت الكامل (عدم التحلل) ، وضع + ، ++ ، +++ لتوضيح التثبيت الجزئى بحيث توضح درجة التثبيت طبقا لحكمك .

الأنبـــوبـة	تثبيت العامل المكمل
١	
٢	
٣	
٤	
٥	
٦	
٧	
٨	
٩	
١٠	

معامل تخفيف الأنتيجين : ـــــــــــــــــــــــ

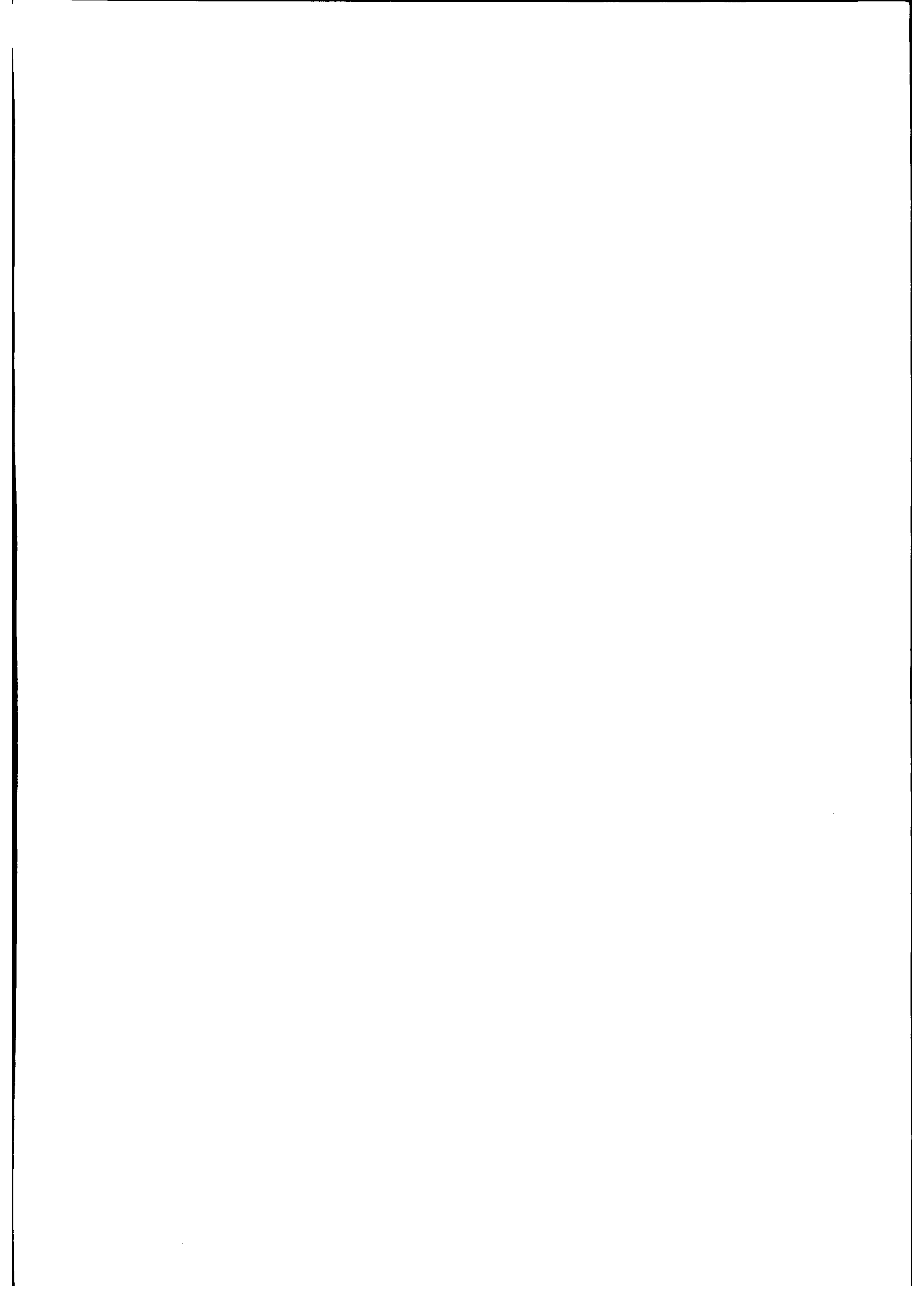


تقـــريـر ٨٤
طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية

الاســـــم : ________________

رقــم المعمــل : ________________

أى العينات تحتوى على سالمونيلا *Salmonella* ؟



تقـــرير ٨٥

الاســـــم : ________________

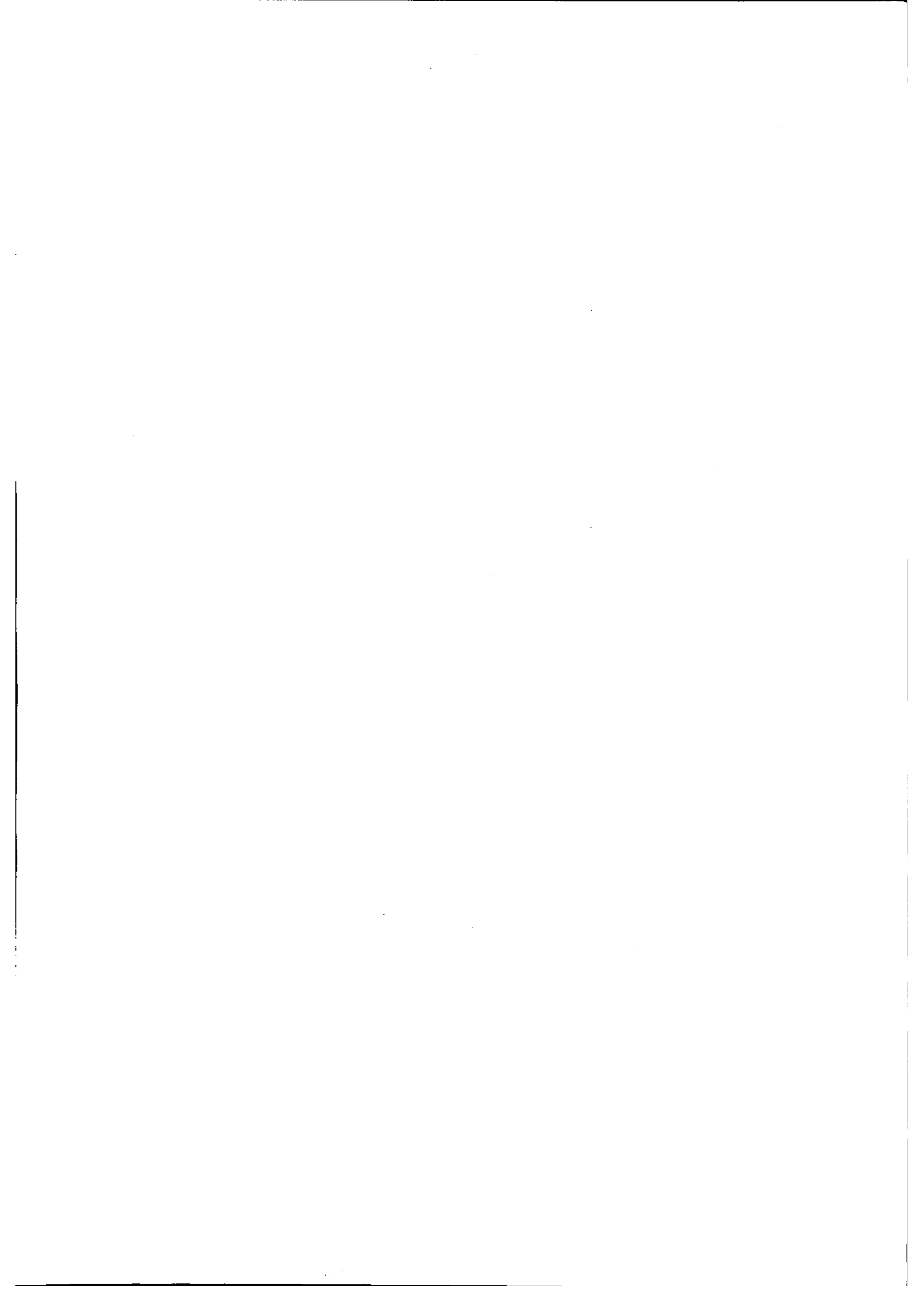
رقـم المعمـل : ________________

الاختبار السيرولوجى لمرض المونونيوكليوزس المعدى

سجل مدى التجمع على شريحتك ، مستخدما المقياس من صفر (عدم تجمع) إلى ++++ (تجمع شديد) .

المـــربـع الأول	المـــربـع الثـــانـى

هل تحتوى عينة السيرم على أجسام مضادة لمرض *mononucleosis* ؟



تقـــرير ٨٦

الاســـــم : ________________

رقـم المعمـل : ________________

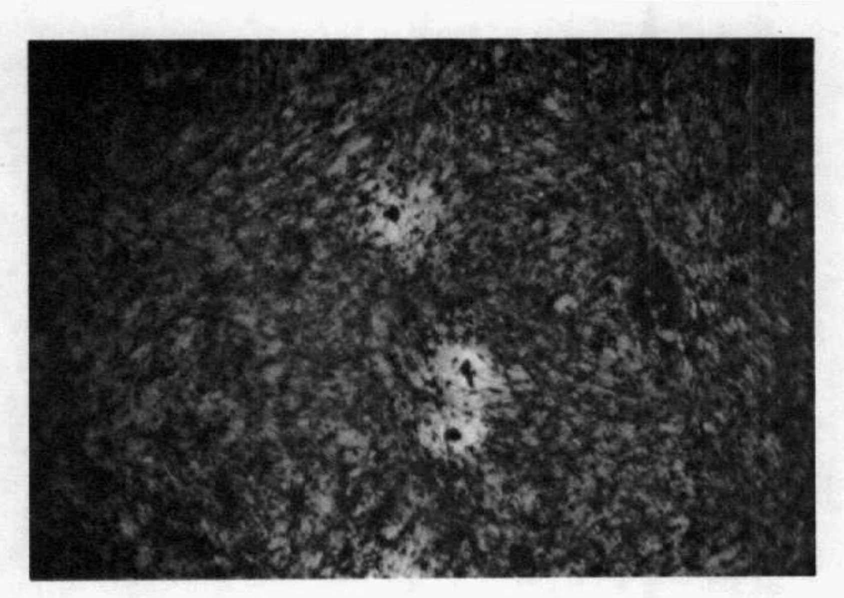
التعرف على الكيميائيات المسرطنة

اختبار ايمز

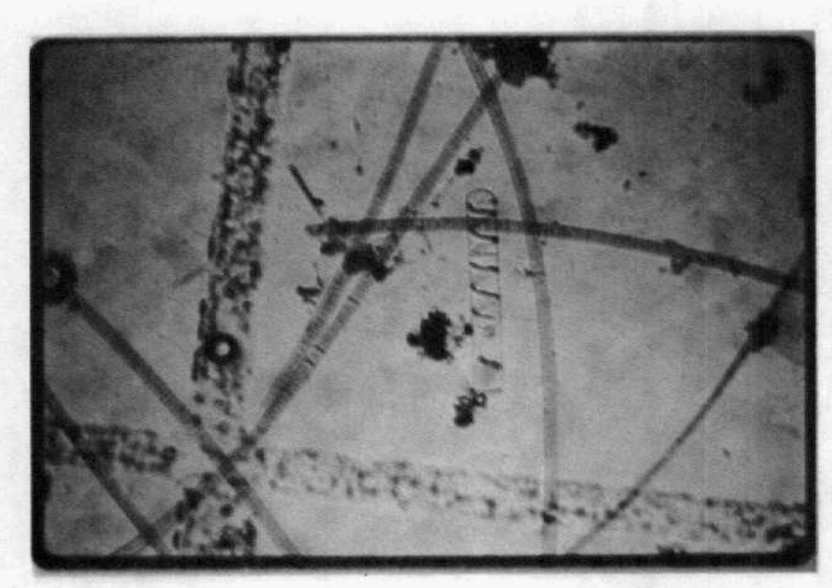
سجل عدد المستعمرات الكبيرة النامية حول الأقراص المحتوية على المواد الكيميائية فى طبق الآجار ، وتلك المتكونة فى الأطباق غير المحتوية على المواد الكيميائية .

المـــادة الكيميائية	آجـار بيـئة الكفــاف	الآجــار المغــذى

أى المواد الكيميائية يعتبر مطفرا ؟



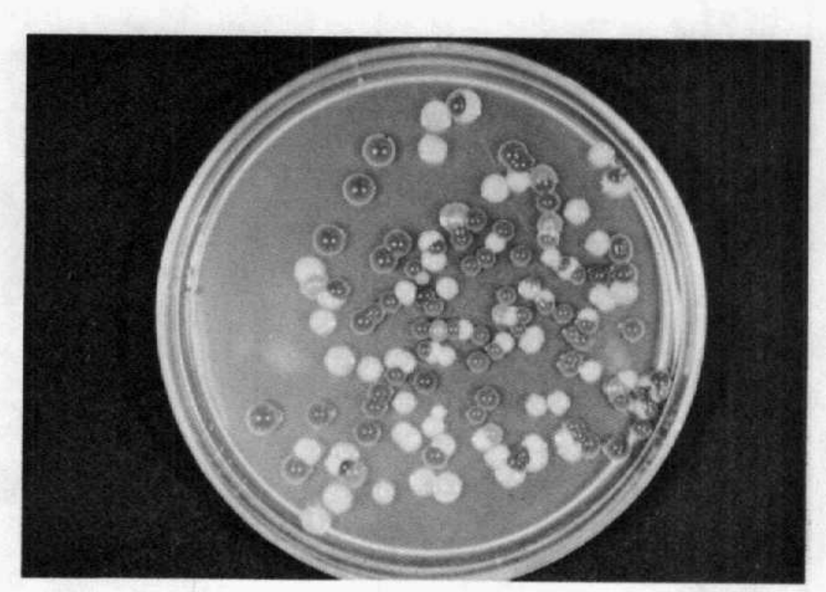
لوحة ملونة رقم ١ :
بلاكات فيروسية على مزرعة
نسيجية وحيدة الطبقة (× ٦٠)



لوحة ملونة رقم ٢ :
هائمات مائية نباتية (× ٦٣)
إهداء من Millipore Corporation



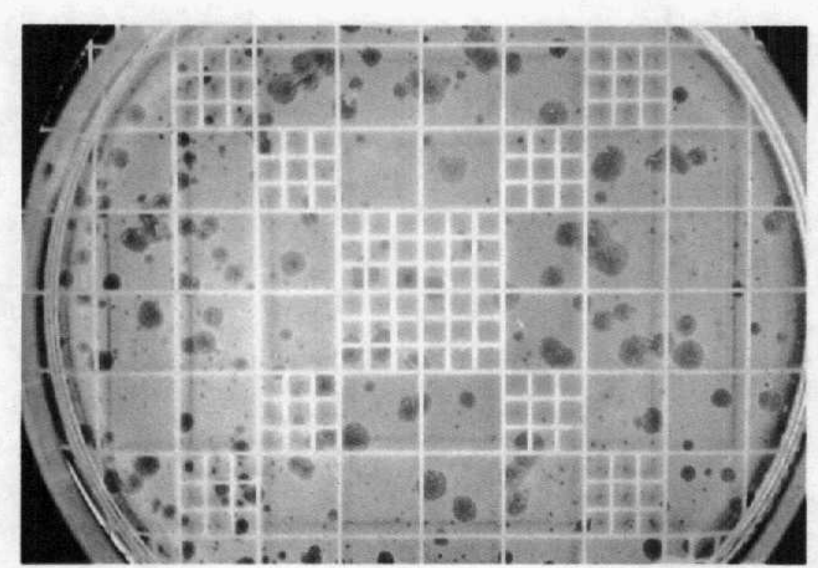
لوحة ملونة رقم ٣ :
هيفا وجراثيم لاجنسية للفطر Alternaria (× ٦٤)



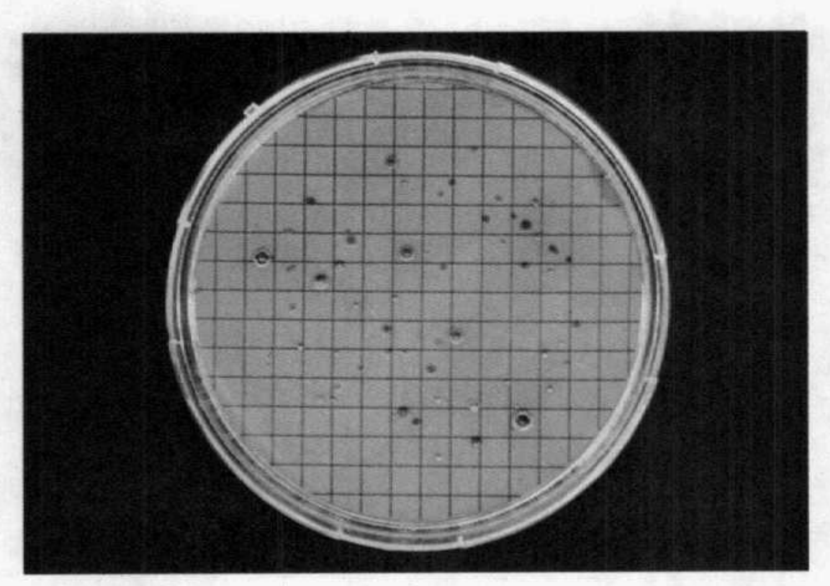
لوحة ملونة رقم ٤ :
مستعمرات ملونة وغير ملونة لبكتيريا
Serratia marcescens (× ٥١)
إهداء من **S.S. Schneierson**



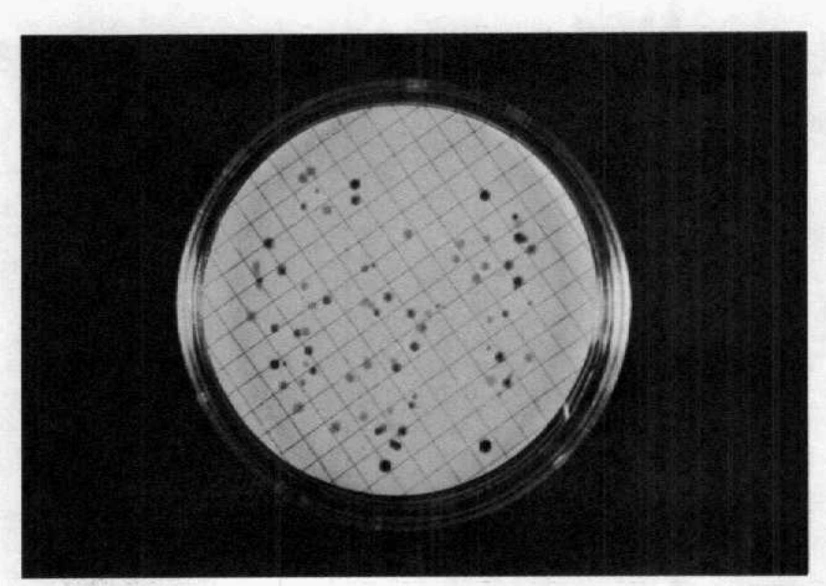
لوحة ملونة رقم ٥ :
النمو الشبيه بالجذر لبكتيريا
Bacillus cereus var. mycoides
. (٤٧ ×)



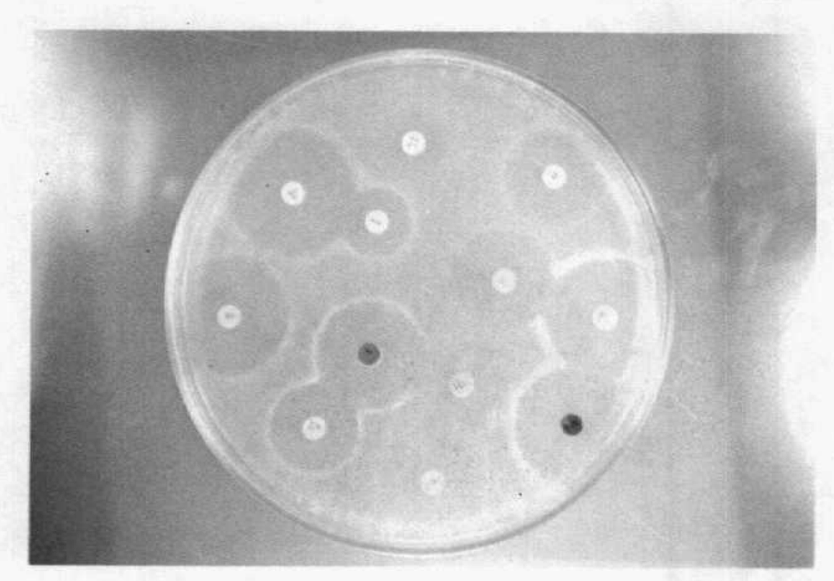
لوحة ملونة رقم ٦ :
بلاكات فيروس البكتيريا على طبق آجار
. (٥٦ ×)



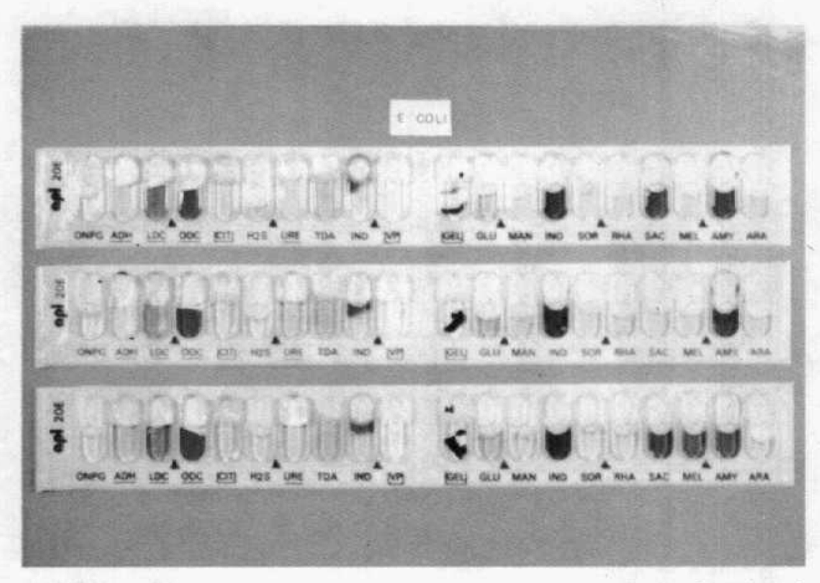
لوحة ملونة رقم ٧ :
مستعمرات بكتيريا القولون على مرشح غشائى
وبيئة مرق إندو (× ٦٩)
إهداء من Millipore Corporation



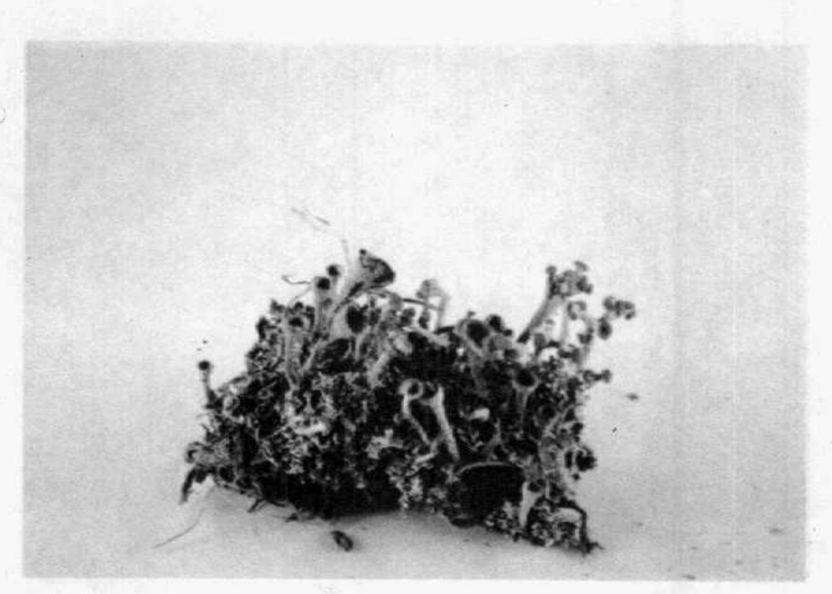
لوحة ملونة رقم ٨ :
مستعمرات البكتيريا السبحية البرازية
على مرشح غشائى وبيئة آجار KF
(٦٩ ×)
إهداء من Millipore Corporation



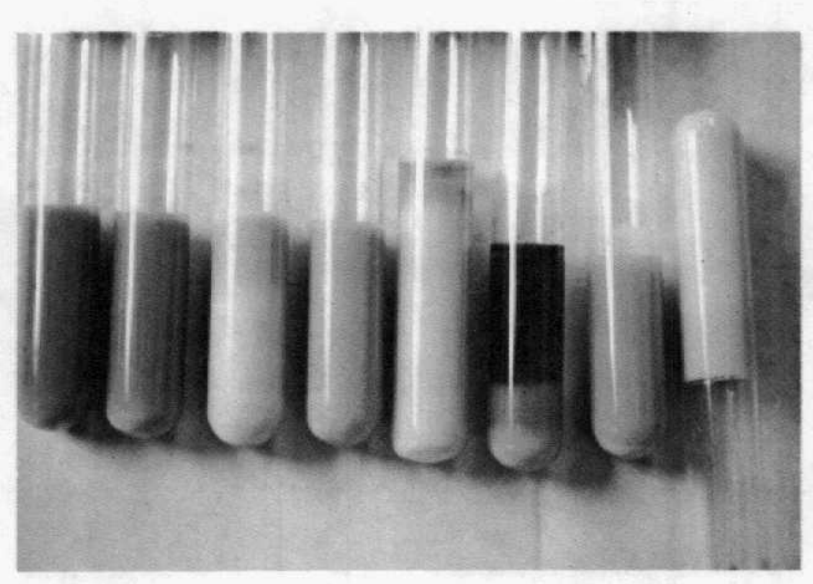
لوحة ملونة رقم ٩ :
اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (× ٧٧)



لوحة ملونة رقم ١٠ :
تفاعل *E. coli* على شريط **API 20**
إهداء من **Analytab products, a division of Ayerst Laboratories.**



لوحة ملونة رقم ١١ :
بعض الأشنات الشائعة (× ٣١)
إهداء من
Turtox, Inc. Chicago, Illinois



لوحة ملونة رقم ١٢ :
بعض تفاعلات لبن عباد الشمس (× ٤١)

Index — فهــــرس المصطلحـــات العلميـــة

English	العربية
Absorbance	امتصاص
Acceleration growth phase	طور النمو المتزايد (المتسارع)
Acetobacter	جنس الأسيتوباكتر (بكتيريا حامض الخليك)
Acetylmethylcarbinol (acetoin)	أسيتيل ميثيل كربينول (أسيتوين)
Acid alcohol	كحول حامضى
Acid curd	خثرة حامضية
Acid-fast stain	صبغ البكتيريا الصامدة للأحماض
Acid production	إنتاج حامض
Acriflavin	أكريفلافين
Actidione agar	آجار الاكتيديون
Adonitol	أدونيتول
Adsorption viruses	فيروسات الادمصاص
Aerobacter aerogenes (Enterobacter aerogenes)	نوع بكتيريا إيروباكتر أروجينيز (أو انيتروباكتر أروجينيز)
Aerobic microorganisms.	ميكروبات هوائية
Aerobic respiration	تنفس هوائى
Aerotolerant organisms	ميكروبات تتحمل الهواء
Agar	آجار
Agar-shake tube	أنبوبة مزرعة آجار مهتزة
Agar slant	آجار مائل
Agar stab	آجار الوخز
Agglutination	تجمع
Alcaligenes viscolactis	نوع بكتيريا الكاليجينز فسكولاكتيس
Alcoholic fermentation	تخمر كحولى
Alcohols. polyhydric	كحولات متعددة المجاميع الكحولية
Algae	طحالب
in polluted water	فى المياه الملوثة
Alkaline curd	خثرة قاعدية
Alkaline phosphatase	إنزيم الفوسفاتيز القاعدى
Alkaline reversion	تحول قاعدى

Allantoic cavity	تجويف الآنتيوزى
American Type Culture Collection	المركز الأمريكى لتجميع المزارع الميكروبية
Ames test for chemical carcinogens	اختبار أيمز للكيميائيات المسرطنة
Amine production	إنتاج الأمين
Amino acid assay	تقدير الأحماض الأمينية
Amino acid production	إنتاج الأحماض الأمينية
p- Aminobenzoic acid	حمض الباراأمينو بنزويك
p- Aminodimethylaniline oxalate	باراأمينو داى ميثيل أنيلين أكسلات
Ammonia	أمونيا
Ammonification	نشدرة
Amoeba	أميبا
Amygdalin	أمجدالين
Amylase	إنزيم الآميليز
Anabaena	طحلب الأنابينا
Anaerobic culture techniques	طرق الزراعة اللاهوائية
Anaerobic incubator	محضن لا هوائى
Anaerobic jar	وعاء لاهوائى
Anaerobic microorganisms	ميكروبات لا هوائية
Anaerobic respiration	تنفس لا هوائى
Ancalomicrobium	جنس أنكالوميكروبيم
Antibiogram	نظام مدى التأثير الحيوى
Antibiosis	التضاد الحيوى
Antibiotic discs	أقراص المضادات الحيوية
Antibiotic resistance of microorganisms	مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية
Antibiotics	مضادات حيوية
Antibodies	أجسام مضادة
Antigen-antibody reactions	تفاعلات الأنتيجين مع الجسم المضاد
Antigenic titer	معامل تخفيف (تركيز) الأنتيجين
Antigens	أنتيجينات (مولدات الأجسام المضادة)
soluble	الذائبة
Antimetabolites	مضادات التمثيل الغذائى
Antiseptics	مطهرات
Antisera (antibodies)	سيرم مضاد (انتيسيروم)
Aperture numerical	الفتحة العددية (الفتحة الرقمية) للعدسة
API technique	طريقة APT لتعريف البكتيريا المعوية
Apple-juice medium	بيئة عصير التفاح

APT agar	اجار APT
APT-calcium carbonate agar	آجار APT مع كربونات كالسيوم
Araban	أرابان (سكر معقد)
Arabinose	سكر أرابينوز
Archaebacteria	مجموعة بكتيريا الأركيبكتيريا
Ascomycetes	الفطريات الأسكية
Ascospores	جراثيم أسكية
Ascus	كيس أسكى
Asepsis	منع التلوث
Aseptic technique	طريقة العمل تحت ظروف معقمة
Aspergillus	فطر الأسبرجليس
Assay. microbiological	التقدير الكمى باستخدام الميكروبات
Athiorhodaceae	عائلة بكتيريا أثيوروداسيا
Athlete's foot	قدم مصابة بالتهاب فطرى – مرض قدم الرياضى
Aureomycin	أروميسن (مضاد حيوى)
Autoclave	أوتوكلاف
Autoclaving	التعقيم بالأوتوكلاف (البخار تحت ضغط)
factors in	العوامل المؤثرة فيه
procedure for	طريقة عمله
Autotrophs	ميكروبات أوتوتروفية (ذاتية التغذية)
Auxotrophs	طفرات العوز الغذائى
Azide agar	آجار الأزيد
Azotobacter	بكتيريا الأزوكوباكتر
Bacillus anthracis	باسلس أنثراسيس (بكتيريا الجمرة الخبيثة)
B. cereus	باسلس سيرس
B. stearothermophilus	باسلس استيروثرموفلس
B. subtilis,	باسلس ساتلس
Bacterial variations	تغيرات بكتيرية
Bacteriochlorophylls	كلوروفيل بكتيرى
Bacteriocidal	قاتل للبكتيريا
Bacteriophage	فيروس البكتيريا (بكتريوفاج)
Bacteriorhodopsin	بكتريورودوبسين (الصبغة الممثلة للضوء فى الهالوبكتيريا)
Bacteriostatic agents	عامل موقف لنمو البكتيريا
Bacteriod forms	أطوار بكترويدية
Barbital-buffered saline	محلول ملحى منظمة حموضته بالباربيتال
Basic dye or stain	صبغة قاعدية

Basidia	حوامل باذيدية
Basidiomycetes	فطريات باذيدية
Basidiospore	جرثومة باذيدية
BCP carbohydrate media	بيئات كربوهيدراتية بها دليل BCP
BCP lactose agar	بيئة آجار لاكتوز مع دليل BCP
Beer. unpasteurized draught	بيرة دراوت غير مبسترة
Beggiatoa	جنس بكتيريا بجياتوا
Beneckea natriegens	بكتيريا بنيكيا ناتريجنس
Bergey's Manual of Determinative Bacterilolgy	كتاب برجى لتعريف البكتيريا
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	الاحتياج البيوكيميائى للأكسجين
Biotin-histidine solution	محلول بيوتين وهستيدين
Blood, reaction on:	الدم ــ التفاعل معه
alpa hemolysis	تحلل الهيموجلوبين من النوع ألفا
beta hemolysis	تحلل الهيموجلوبين من النوع بيتا
gamma hemolysis	تحلل الهيموجلوبين من النوع جاما
greening	اخضرار الدم
Blood agar	آجار الدم
Blue-green bacteria	البكتيريا الخضراء المزرقة
BOD (Biochemical Oxygen Demand)	الاحتياج البيوكيميائى للأكسجين
Borate buffer	محلول منظم بالبورات
Borate saline	محلول ملحى مع بورات
Brain-heart infusion broth	بيئة مرق مستخلص المخ والقلب
Brain-heart infusion salt-starch agar	بيئة آجار مستخلص المخ والقلب مع الملح والنشا
Breed method	طريقة بريد
Brewer anaerobic jar	وعاء بريور اللاهوائى
Brilliant green dye	صبغة البرليانت جرين
Brom cresol blue	برو كريزول بلو
Brom cresol green	بروم كريزول جرين
Brom cresol purple	بروم كريزول بربل
Brom thymol blue	بروم ثيمول بلو
Brownian movement	حركة براونية
Budding	تبرعم
Buffered distilled water	ماء مقطر منظم الحموضة
Buffers	المواد المنظمة للحموضة
Burst size	حجم الانفجار (عدد الفاجات التى تخرج بعد انفجار البكتيريا)
Buttermilk, preparation and microbiology of	اللبنة ــ إعدادها ودراستها ميكروبيولوجيا

C-600 cells	خلايا سلالة C600
Cabbage	كرنب
Candida albicans	كانديدا البيكانس (خميرة)
Candling eggs	فحص البيض فى الضوء
Capsid	كابسيد (الغطاء البروتينى للفيروس)
Capsomeres	كابسومير (الوحدات البنائية لغطاء الفيروس)
Capsule	علبة البكتيريا — كابسول
Capsule stain	صبغة علبة البكتيريا
Carbohydrate broth	مرق الكربوهيدرات
Carbohydrates	الكربوهيدرات
Carbol fuchsin	صبغة كربول الفوكسين
Carcinogens, test for	المسرطنات ، الفحص لوجودها
Carotenoids	الصبغات الكاروتينية
Caryophanon	جنس كريوفانون (بكتيريا)
Casein	كازين (بروتين اللبن)
Casein hydrolysis	التحلل المائى للكازين
Catalase	إنزيم الكاتاليز
Caulobacter	جنس كالوباكتر (بكتيريا)
Cell mas, determinations of	الكتلة الخلوية ـــ تقديرها
Cellobiose	سكر السللوبيوز
Cellular slime molds	الفطريات اللزجة الخلوية
Cellulose	سليولوز
Cell-wall stain	صبغ الجدار الخلوى
Cetyl-pyridinium chloride	سيتيل بيريدنيوم كلوريد
CFU (colony-forming unit)	الوحدة المكونة للمستعمرة
Cheese, microbiology of	الجبن ، ميكروبيولوجيا الجبن
Chemoheterotrophs	ميكروبات عضوية التغذية ، مصدر الطاقة كيميائى
Chick-embryo culture	الزراعة فى جنين بيضة الدجاج
Chloramphenicol	كلورامفنيكول (مضاد حيوى)
Chlorobium	جنس كلوروبيوم (بكتيريا)
Chlorophyll	كلوروفيل
Chlortetracycline	كلوروتتراسيكلين (مضاد حيوى)
Chromatium	جنس كروماتيوم (بكتيريا)
Ciliata	الهدبيات
Citrate utilization	استخدام السترات
Clone	مستعمرة مكروبية ناتجة عن خلية واحدة

Clostridium	جنس كلوستريديوم (بكتيريا)
C. perfringens	كلوستريديوم برفرنجنز
C. sporogenes	كلوستريديوم اسبوروجينز
Coagulase	إنزيم كواجيوليز
Coenocytic mycelium	ميسيليوم متعدد الأنوية
Coliform bacteria	بكتيريا القولون
Colony, microbial	مستعمرة مكروبية
Colony (plate) count	عد المستعمرات بالأطباق
Colony-forming unit (CFU)	وحدة مكونة للمستعمرة
Columella	كوليوميللا
Commensalism	المعايشة والاستفادة من طرف واحد
Competent cells	خلية قادرة على الاتحاد الوراثى
Complement	العامل المكمل
Complement-fixation technique	طريقة تثبيت العامل المكمل
Completed test	الاختبار التكميلى
Complex media	بيئات معقدة ، غير محددة التركيب
Compound microscope	ميكروسكوب مركب
description	وصفه
use	استخدامه
Condenser, substage	المكثف ، ـــ تحت المسرح
Confirmed test	الاختبار التأكيدى
Congo red	صبغة أحمر الكونغو
Conidia	كونيديات
Conidiospores	جراثيم كونيدية
Conjugation	التزاوج
Coulter counter	عداد كولتر
Count	العد
colony	عد المستبعمرات
direct microscopic	العد بالميكروسكوب المباشر
Counterstain	صبغة مضادة
Counting plate	طبق العد
CPE (cytopathic effect)	تأثير العامل المسبب للمرض على خلايا مزارع الأنسجة أو العائل
Cresol red	صبغة أحمر الكريزول
Crystal violet	صبغة الكرستال البنفسجى
Culture	مزرعة ميكروبية
preservation of	حفظ المزارع

pure	مزرعه نقية
Cultured buttermilk	لبنة
Culture media	بيئات مزرعية
broth	مرق (بيئة سائلة)
solid	بيئات صلبة
Curd	خثرة
Curled colony	مستعمرة مجعدة
Cyanobacteria	البكتريا الخضراء المزرقة
Cytochrome oxidase test	اختبار السيتوكروم أكسيديز
Cytochromes	السيتوكرومات
Cytopathic effect (CPE)	تأثير العامل المسبب للمرض على خلايا مزارع الأنسجة أو العائل
Dark-field microscopy	ميكروسكوب الحقل (المجال) المظلم
Deamination	نزع مجاميع الأمين
Decarboxylation	نزع مجاميع الكربوكسيل
Deca-strength broth for bacteriophage isolation	مرق البكتريوفاج المركز عشر مرات لعزل البكتريوفاج
Decolorizing agent	عامل قاصر للالوان
Defined media	بيئات محددة التركيب
Denitrification	انطلاق النيتروجين
Deoxyribonuclease (DNase)	إنزيم دى أوكسى ريبونيوكلياز
Desoxycholate agar	بيئة آجار الديزوكسى كولات
Desulfovibrio	جنس ديسالفوفبريو (بكتيريا)
Deuteromycetes	الفطريات الناقصة
Dextrin	دكسترين
Dextrose	سكر الدكستروز
Diaphragm	الحجاب
annular	حجاب ميكروسكوب متباين الأطوار ، حجاب حلقى
iris	حجاب ايرس
Diastatic organisms	ميكروبات محللة للنشا
Dictyostelium discoideum	فطر دكتيوستليوم ديسكوديوم
Differential plating	طريقة الاطباق التفريقية
Differential stain	صبغة تفريقية
Diffraction plate	لوحة تشتيت
Dilution count	العد بالتخفيف
Dilution factor	معامل التخفيف
Dimers, from pyrimidine in UV radiation	ثنائى البيريميدين الناتج عن المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية

Diphenylamine reagent	دليل داى فينيل أمين
Direct microscopic count	العد الميكروسكوبى المباشر
derivation of factor	حساب معامل العد بالميكروسكوب المباشر
Disaccharides	السكريات الثنائية
Disinfectants	المواد القاتلة للميكروبات
DNA	الحامض النووى د.ن.أ
extraction of	استخلاصه
transfer of	نقله
and UV radiation	تأثير الأشعة فوق البنفسجية عليه
DNase (deoxyribonuclease)	الإنزيم المحلل لد د.ن.أ
DNase test agar	آجار اختبار الإنزيم المحلل لد د.ن.أ
Dulcitol	دلسيتول
Durham tube	انبوبة درهام
Egg yolk agar	بيئة آجار مح (صفار) البيض
Electron mircoscope	الميكروسكوب الإلكترونى
scanning	الماسح – الكاسح
tansmission	النافذ
EMB (eosion methylene-blue) agar	بيئة آجار الإيوسين ، وأزرق الميثلين
Embryonating chicken eggs	بيض متكون به جنين
Endo agar	بيئة آجار إندو
Endo medium, modified	بيئة إندو المعدلة
Endospore	الجرثومة الداخلية
Endospore stain	صبغ الجرثومة الداخلية
Energy source	مصدر الطاقة
Enrichment selection technique	طريقة الانتخاب بالإكثار
Enterobacter aerogenes (Aerobacter aerogenes)	أنتيروباكترإيروجينز (إيروباكترايروجينز)
Enterotube II technique	طريقة إنتروتيوب
Environmental influences	المؤثرات البيئية
Enzymatic reactions	التفاعلات الإنزيمية
Enzyme induction	حث تكوين الإنزيم
Eosin	صبغة الإيوسين
Eosin methylene-blue (EMB) agar	بيئة آجار الإيوسين وأزرق الميثلين
Epstein-Barr virus	فيروس إبستين بار (بسبب مرضا فى الغدد اللمفاوية)
Escherichia coli,	إشرشيا كولاى
mutants	طفراتها
Esculin	إسكيولين

Ethylene oxide	آكسيد الإثيلين
Eucaryotes	الكائنات الحقيقية النواة
Euglena gracilis	يوجلينا جراسيليس (طحلب)
Eye lens	العدسة العينية
Facultative anaerobe	ميكروب لاهوائى اختيارى
Fat hydrolysis	التحلل المائى للدهن
Fecal coliforms	مجموعة بكتيريا القولون البرازية
Fecal streptococci	البكتيريا السبحية البرازية
Feces	البراز
Fermentation	التخمر
beverage production by	انتاج المشروبات المتخمرة
of carbohydrates	تخمر الكربوهيدرات
food production by	استخدام التخمر فى إنتاج الغذاء
F factor	عامل الجنس F
F σ̄σ , F - cells	خلايا مذكرة ، وخلايا مؤنثة
FA (fluorescent-antibody) techinque	طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية
Field lens	عدسة المجال
Filamentous colony	مستعمرة خيطية
Filters	مرشحات
Filter sterilization	تعقيم بالمرشحات
Filtration	الترشيح
Fixing a bacteria smear	تثبيت الغشاء البكتيرى
Flagella stain	صبغ أسواط البكتريا (صبغ الفلاجلات)
Flagellate	السوطيات
Flaming	التعقيم باللهب
Flo agar	بيئة آجار فلو
Flourescein	صبغة الفلورسين
Fluorescence microscope	ميكروسكوب فلورسنتى
Fluorescent-antibody (FA) technique	طريقة الأجسام المضادة الفلورسنتية
Focal lenght	البعد البؤرى
Folic acid	حامض فوليك
Food, microbiology of	ميكروبيولوجيا الأغذية
Freeze-drying	التجفيد
Freeze-etching	التحزيز بالتجميد
Fructose	سكر الفراكتوز
Fruit juices, alcoholic fermentation of	عصير الفواكه ـــ تخمره الكحولى

FSFC ratio	نسبة بكتيريا القولون البرازية / البكتيريا السبحية البرازيه
Fungi	الفطر
Fungi Imperfecti	الفطريات الناقصة
Fungus identification	تعريف الفطريات
Galactan	جلاكتان
Galactose	سكر الجلاكتوز
Gas Pak	كيس الغاز
Gas production	إنتاج الغاز
Gelatin hydrolysis	التحلل المائى للجلاتين
Genetic disruption by UV radiation	إتلاف المادة الوراثية بالأشعة فوق البنفسجية
Genotype	طرز جينى
Genotypic variation	تغير الطرز الجينية
Germicidal radiation	الإشعاع القاتل للميكروبات
Glove box	صندوق القفازات
Glucose	جلوكوز
Glucose-acetate medium	بيئة الجلوكوز والخلات
Glucose agar	آجار الجلوكوز
Glucose broth	مرق الجلوكوز
Glucose nitrate-salts agar	بيئة آجار الجلوكوز والنترات والأملاح
Glucose yeast-extract broth	بيئة مرق الجلوكوز ومستخلص الخميرة
Glucosides	الجليكوزيدات
Glycerol	الجلسرول
Glycerol saline solution	محلول ملحى مع جلسرول
Glycogen	الجلايكوجين
Goldfish	سمك المرجان
Gradient agar plate	طبق الآجار المتدرج
Gram's iodine	محلول يود صبغة جرام
Gram stain	صبغة جرام
Grape-juice medium	بيئة عصير العنب
Green sulfur bacteria	بكتيريا الكبريت الخضراء
Growth, balanced	النمو المتوازن
Guinea pig kidney cells	خلايا كلية خنازير غينيا
Halophilic organisms	البكتيريا المحبة للملوحة
Hanging-drop mount	تحضير النقطة المعلقة
Heat resistance of spores	المقاومة الحرارية للجراثيم
Heat shocking	الصدمة الحرارية

Heavy metals as disinfectants	المعادن الثقيلة كمواد قاتلة للميكروبات
Hemagglutination	تجميع الهيم
Hemeporphyrin	الهيم بورفرين
Hemolysin	محللات الهيم
Hemolysis, beta	تحلل الهيم من النوع بيتا
Hemophilus influenzae	هيموفيليس أنفلونزا (بكتيريا)
Heterofermentation	التخمر المختلط
Heterophile antibody	أجسام مضادة هيتروفيلية (الأجسام المضادة المتعددة التفاعل)
Heterotrophs	الميكروبات الهيتروتروفية (غير ذاتية التغذية)
Hexosans	الهكسوزانات العديدة التسكر السداسية
Hexoses	السكريات السداسية
Hfr-235 cells, 125	خلايا عالية التزاوج من السلالة 125
Homofermentation	التخمر غير المختلط
Homologous antiserum	انتيسيرم متخصص (مضاد سيرم مشابه)
Hungate roll tube	أنبوبة هنجات الدوارة
Hydrogen donor, sulfide compounds	مانحات الهيدروجين . مركبات الكبريتيد
Hydrogen peroxide and catalase	فوق أكسيد الهيدروجين والكاتاليز
Hydrogen sulfide production	إنتاج فوق أكسيد الهيدروجين
Hydrolysis	التحليل المائى
Hypertonic medium	بيئة عالية الأسموزية
Hypha,	**هيفات الفطر**
Hyphomicrobium	**جنس هيفوميكروبيوم (بكتيريا)**
Hypotonic medium	**بيئة منخفضة الأسموزية**
Identification of microorganisms	**تعريف الميكروبات**
Illumination, microscopic	**إضاءة الميكروسكوب**
Immersion oil	زيت غمس العدسة الزيتية
Immunodiffusion	الانتشار المناعى
Immunology	علم المناعة
Impregnated test strips	شرائط مغمورة بمحلول الاختبار
IMViC tests	اختبارات إمفك (التفرقة بين أفراد مجموعة القولون)
Indicator organisms	ميكروبات دليل التلوث
Indicators	دلائل
Indirect staining	صبغة غير مباشرة
Indole production	إنتاج الإندول
Infectious mononucleosis, serological test	مرض المونونيوكليوزس المعدى ، اختباره سيرولوجيًا
Infusion	منقوع

Inoculating loop	إبرة تلقيح ذات العقدة
Inoculating needle	إبرة تلقيح
Inoculum	لقاح
Inulin	أنيولين
Iodine-alcohol dlsinfectant	محلول اليود والكحول القاتل للميكروبات
Iodine detection of starch hydrolysis	الكشف عن تحلل النشا باليود
Irregular colony	مستعمرة غير منتظمة
Isolation techniques	طرق عزل الميكروبات
KF agar	بيئة آجار KF
Kirby-Bauer method for antibiotic sensitivity	طريقة كيربى وباور لتقدير الحساسية للمضادات الحيوية
Klebsiella	جنس كلبسيلا (بكتيريا)
Koch's postulates, demonstration of	مقترحات كوخ لتعريف المرض
KOH-creatine reagent	محلول هيدروكسيد البوتاسيوم والكرياتين
Kovacs reagent	دليل كوفاكس
Lactic acid bacteria, isolation of	بكتيريا حامض اللاكتيك – عزلها
Lactobacillus	جنس لاكتو باسلس
L. casei	لاكتو باسلس كزياى
L. plantarum	لاكتو باسلس بلانتارم
Lactose	لاكتوز
Lactose broth	مرق اللاكتوز
Lactose yeast-extract agar	بيئة آجار اللاكتوز ومستخلص الخميرة
Lascelles medium	بيئة لاسيللس
Latent period	فترة الحضانة أو الكمون (الفترة بين وصول الفاج إلى الخلية العائل وظهور النسل)
Legumes	البقوليات
Lenticular colony	مستعمرة عدسية
Leprosy	مرض الجذام
Leuconostoc	جنس ليكونوستك (بكتيريا)
L. citrovorum	ليكونوستك ستروفورم
L. dextranicum	ليكونوستك دكسترانيكم
L. mesenteroides	ليكونوستك ميزنترويدس
Levowitz-Weber stain	صبغة لفوويتز — ويبر
Levulose	سكر ليفيلوز (فراكتوز)
Lichen	أشن
Lipase	انزيم الليبيز
Lipid hydrolysis	التحلل المائى لليبيدات
Litmus milk	لبن عباد الشمس

Lobate colony	مستعمرة مفصصة
Loop dilution	التخفيف بالإبرة ذات العقدة
Lyophilization	الحفظ بالتجفيد
Lysozyme	انزيم ليسوزيم (محلل لخلايا البكتيريا)
Lytic cycle	دورة تحللية (فى فيروسات البكتيريا)
Macrophage	اللاقمات الكبيرة
Magnification	التكبير
Malachite green stain	صبغة أخضر الملاكيت
Maltose	المالتوز (سكر)
Mannitol	المانيتول
Mannitol agar	آجار المانيتول
Mannitol broth	مرق المانيتول
Mannose	المانوز (سكر)
May-Grunwald stain	ماى ــ جرانوالد (صبغة)
Measurements, microscopic	قياسات ميكروسكوبية
Media	بيئات
Medical microbiology	ميكروبيولوجيا طبية
Melibiose	مللبيوز (سكر)
Melizitose	مليزيتوز
Membrane filters	مرشحات غشائية
M-Endo broth	بيئة مرق إندو المعدلة
Mesophiles	ميزوفيليه (ميكروبات محبة للحرارة المتوسطة)
Metal shadowing	تظليل بالمعادن
Methylene blue, acidified solution for direct microscopic stain	أزرق الميثلين ــ المحمض للفحص الميكروسكوبى المباشر
Methylene blue chloride	أزرق الميثلين ، كلوربد
Methylene blue stain	أزرق الميثلين (صبغة)
Methyl red indicator	أحمر ميثيل (دليل)
Methyl redVoges-Proskauer (MR-VP) tests	اختبار أحمر الميثيل ــ فوجز بروسكور
M-FC broth	بيئة مرق إم ــ إف ــ سى M - FC المعدلة
Microaerophilic organisms	ميكروبات محبة للهواء بكمية قليلة
Microbial ecology	علم البيئة الميكروبى
Microbiology	علم الميكروبيولوجى
Micrococcus	جنس ميكروكوكس (بكتيريا)
Micrometer	ميكرومتر
ocular	ميكرومتر العينية

Myxococcus	جنس مكسوكوكس (بكتيريا)
a-Naphthol	دليل الفانافثول
a-Naphthylamine reagent	دليل الفانافثل أمين
Negative staining	الصبغ السالب
Neisseria catarrhalis	نيسيريا كاتاراليس
Nessler's reagent	محلول نسلر
Newcastel disease virus	فيرس مرض النيوكاسل
Niacin assay	التقدير الحيوى للنياسين
Niacin broth	مرق النياسين
Nigrosine	نجروسين (صبغة)
Nitrate broth	مرق النترات
Nitrate formation	تكوين النترات
Nitrate-formation medium	بيئة تكوين النترات
Nitrate reduction	اختزال النترات
Nitrification	النترتة أو التأزت
Nitrite formation	تكون النتريت
Nitrite-formation medium	بيئة تكوين النتريت
Nitrobacter	جنس نتروباكتر (بكتيريا)
Nitrogen cycle	دورة النيتروجين
Nitrogen fixation	تثبيت النيتروجين الجوى
nonsymbiotic	لا تكافلى
symbiotic	تكافلى
p-Nitrophenyl phosphate (NPP)	بارار نتروفينيل فوسفات
Nitorsomonas	جنس نتروزوموناس (بكتيريا)
Novobiocin-penicillin-cycloheximide	بيئة آجار نوفوبيوسين ـــ بنسلين ـــ سيكلوهكسيميد
NPP (p-nitrophenyl phosphate)	بارا – نتروفينيل فوسفات
Nuclease	إنزيم نيوكلياز
Nucleocapsid	نيوكلوكابسيد (مركز الفيروس + الغطاء)
Numerical aperture	الفتحه العددية ، الرقمية
Nutrient agar	آجار مغذى
Nutrient broth	مرق (بويون) مغذى
Nutrient gelatin	جيلاتين مغذى
Nutrition, microbial	تغذية المكروبات
Objective, microscope	العدسة الشيئية للميكروسكوب
high-dry	الكبرى الجافة
low-power	الصغرى

oil-immersion	العدسة الزيتية
Ocular	العدسة العينية
OF(oxidation-fermentation) agar	بيئة آجار الأكسدة والتخمر
Oil immersion	زيت الغمس للعدسة الزيتية
Osmophilic microbes	ميكروبات محبة للأسموزية
Osmotic pressure, effect on growth	الضغط الأسموزى ـــ تأثيره على النمو
Ouchterlony immunodiffusion technique	طريقة أوكترلونى للانتشار المناعى
Oxidase reagent	دليل إنزيم الأكسيديز
Oxidase test	اختبار الأكسيديز
Oxidation-fermentation (OF) agar	بيئة آجار الأكسدة والتخمر
Oxygen requirement of microorganisms	الاحتياج الأكسجينى للميكروبات
Parasitism	التطفل
Pasteurization	البسترة
Pathogenicity	القدرة الإمراضية
Pediococcus	جنس بديوكوكس (بكتيريا)
Pellicle	نمو سطحى على البيئة السائلة ، غشاء
Penicillin	بنسلين (مضاد حيوى)
production medium	بيئة انتاجية
Penicillium	فطر البنسليوم
P. chrysogenum	بنسليوم كريسوجينم
Pentosans	بنتوزانات (معقد سكريات خماسية)
Pentoses	سكريات خماسية
Peptone broth	مرق (بويون) الببتون
Peptonization	تحلل البروتين
Percent transmission	النسبة المئوية للضوء النافذ
Petri plate	أطباق بترى
pH	الرقم الأيدروجينى
agar	للآجار
determination	تقديره
meter	جهاز قياسه
paper	ورق تقديره
potentiometirc methods	طرق قياس الجهد الكهربى
Phage	الفاج (فيروس البكتيريا)
Phagocytic cell	خلايا لاقمة
Phagocytic index	معامل الالتقام
Phagocytosis	الالتقام

Phagotrophism	التغذية بالالتقام
Phase contrast	تباين الأطوار الضوئى
bright	التباين المضئ
dark	التباين المظلم
Phenol coefficient	المعامل الفينولى
Phenolphthalein	فينولفثالين (دليل)
Phenol red	أحمر الفينول (دليل)
Phenol red media	بيئة أحمر الفينول
Phenotypic variation	تغير الشكل الظاهرى
Phenylalanine agar	بيئة آجار الفينيل الانين
Phosphate-buffered saline	محلول ملحى منظم بالفوسفات
Phspholipids	الفوسفوليبيدات
Photocolorimeter	جهاز طرق القياس الضوء لونية
Photoreactivation	التنشيط الضوئى
Photoreduction	اختزال ضوئى
Photosynthesis	التمثيل الضوئى
Phototrophs	ميكروبات ضوئية التغذية
Phycomycetes	الفطريات الطحلبية
Phytoplankton	الهائمات المائية النباتية
Plankton	الهائمات المائية
Plaques	بقع خالية من النمو البكتيرى لتحللها بواسطة الفاج
Plasma dried	البلازما الجافة
Plasmid-mediated lactose fermentation	تخمر اللاكتوز المحكوم بالبلازميد
Plasmids	البلازميدات
Plasmodium	بلازموديوم (بروتوزوا)
Plasmolysis	الإنكماش الأسموزى ، بلزمة
Plasmoptysis	الانتفاخ الأسموزى
Plate (colony) count	عد المستعمرات بالأطباق
Plate-count agar	بيئة آجار العد بالأطباق
Plating procedure, quantitative	طريقة الأطباق الكمية
PML (polymorphonuclear leucocyte)	خلايا الدم البيضاء المتعددة الأشكال والأنوية
Pollution	تلوث
Polyhydric alcohols	كحولات عديدة الأيدروكسيل
Polymorphonuclear leucocyte (PML)	خلايا الدم البيضاء المتعددة الأشكال والأنوية
Polysaccharides	سكريات عديدة
Polyvalent conjugates	أجسام مضادة متعددة الاتحاد

Postselective enrichment	عملية إكثار بعد الانتخاب
Potassium hydroxide with creatine	محلول أيدروكسيد بوتاسيوم مع كرياتين
Potato dextrose agar	بيئة آجار البطاطس والدكستروز
Pour plate	أطباق مصبوبة
Precipitin reaction	تفاعل الترسيب
Precipitin ring test	اختبار حلقة الترسيب
Predation	الافتراس
Preservation of cultures	حفظ المزارع
Presumptive test	الاختبار الاحتمالى
Procaryotes	الكائنات البدائية النواة
Propionibacterium	جنس بروبيونيكتيريوم (بكتيريا)
Proteins	بروتينات
Proteolysis	تحلل البروتين
Proteus	جنس بروتيس (بكتيريا)
P. vulgaris	بروتيس فلجارس
Prototroph	أولية التغذية
Protozoa	بروتوزوا
Pseudomonad isolation	عزل السيدومونادات
Pseudomonas	جنس سيدوموناس (بكتيريا)
P. aeruginosa	سيدوموناس إيروجنوزا
P. fluorescens	سيدوموناس فلورسنس
P. putida	سيدوموناس بيوتيدا
Pseudomonas agar F	بيئة آجار السيدوموناس إف
Pseudomonas agar P	بيئة آجار السيدوموناس بى
Pseudoplasmodium	بلازموديوم كاذب
Pseudopodia	أقدام كاذبة
Psychrophiles	الميكروبات المحبة للبرودة
Pulvinate colony	مستعمرة قطرية
Punctiform colony	مستعمرة راس الدبوس
Purple bacteria	البكتيريا القرمزية
nonsulfur	البكتيريا القرمزية غير الكبريتية
sulfur	البكتيريا القرمزية الكبريتية
Pyocyanin	بيوسيانين (صبغة)
Pyrimidine dimers from UV radiation	ثنائى البيرميدين الناتج عن المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية
Pyruvic acid	حامض بيروفيك
Quantitative plating	طريقة الأطباق الكمية ، العد بالأطباق

Quebec colony counter	عداد كويبك للمستعمرات
Rabbit antihorse serum	انتيسيروم حصان مجهز فى الأرنب
Raffinose	سكر الرافينوز
Rancidity	التزنخ
Rat liver homogenate	مجنس كبد الفأر
Reagents and stains	المحاليل والصبغات
Real image	صورة حقيقية
Recombination	اتحاد وتجميع وراثى
Refractive index	معامل الانكسار
Rennet-type enzyme	إنزيمات شبهية برينين المنفحة
Replication interference by UV radiation	تأثر التكاثر بالمعاملة بالأشعة فوق البنفسجية
Repression selection	الانتخاب بالتثبيط
Resolving power, microscope	القدرة التوضيحية للميكروسكوب
Respiration, aerobic and anaerobic	التنفس الهوائى واللاهوائى
Respiratory enzymes	إنزيمات التنفس
Rhamnose	سكر الرامنوز
Rhizobium	جنس الرايزوبيوم (بكتيريا)
Rhizoid colony	مستعمرة جذرية
Rhizopoda	الأميبيات
Rhodopseudomonas spheroides	رودو سيدوموناس اسفرويدس
Rhodospirillum	جنس رودوسبيرلوم (بكتيريا)
R. rubrum	رودوسبيرلوم روبرم
Ring test, precipitin	اختبار الحلقة — ترسيب
Root nodules	العقد الجذرية
Rumen of cow	كرش البقرة
Saccharomyces cerevisiae	خميرة سكاروميسيس سرفسيا
life cycle	دورة حياتها
variety *ellipsoideus*	السلالة إلبسويدس
Safranin	الصفرانين
Saline	محلول ملحى
Saline citrate	محلول ملحى مع سترات
Salmonella	جنس سالمونيلا (بكتيريا)
antiserum	مضاد لسيرم
mammalian microsome test	اختبار ميكروسوم الثدييات
S. pullorum	سالمونيلا بللورم
S. typhi	سالمونيلا تيفاى

S. typhimurium, histidine-dependent	سالمونيلا تيفيموريوم ــ التى تحتاج الهستيدين
Salt tolerant	متحمل للملوحة
Sanitation	التطهير
Sauerkraut, preparation and microbiology of	الكرنب المخلل ، إعداده ودراسته ميكروبيولوجيًا
Sediment in cultures	راسب المزرعة
Selective environment	وسط انتقائى
Selective plating	أطباق انتقائية
Selenite cystine broth	مرق السلينايت والسيستين
Sensitivity tests for antibiotics	اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية
Septate mycelium	ميسليوم مقسم
Serological test	اختبار سيرولوجى
Serology	علم السيرولوجى
Serratia	جنس سراتيا (بكتيريا)
S. marcescens	سراتيا مرسسنس
Sheep cell hemolysin	الأجسام المضادة المحللة لكرات الدم الحمراء للغنم
Sheep red blood cells	خلايا كرات الدم الحمراء للغنم
Silica gel	سيلكا جل
SIM medium	بيئة إس أى إم
Simmon's citrate agar	بيئة سيمون آجار السترات
Simple microscope	ميكروسكوب بسيط
description	وصفه
use	استخدامه
Single-step growth, bacteriophage	النمو ذو المرحلة الواحدة للفاج
Skim-milk agar	بيئة آجار اللبن الفرز
Slant, agar	آجار مائل
Slide agglutination test	اختبار التجمع على الشريحة
Slide culture	مزرعة على الشريحة
Slime formation by bacteria	تكوين البكتيريا للزوجة
Slime molds	فطريات لزجة
Slope, agar	آجار مائل
Sodium azide agar	بيئة آجار أزيد الصوديوم
Sodium thioglycollate	ثيوجليكولات الصوديوم
Sodium thiosulfate	ثيوكبريتات الصوديوم
Soft agar	آجار طرى
Soil, microbiology of	ميكروبيولوجيا الأراضى
Sorbitol	سوربيتول

Sorbose	سكر سربوز
Sphaerotilus	جنس سفيروتيلس (بكتيريا)
Sporangiospores	جراثيم أسبورانجية
Sporangium	كيس أسبورانجى
Spores	جراثيم
Sporozoa	بروتوزوا جرثومية
Spread plate	أطباق منشورة
Staining	الصبغ
Stain(s)	صبغة
acid-fast	الصبغة الصامدة للأحماض
acidic	صبغة حامضية
basic	صبغة قاعدية
capsule	صبغة العلبة
cell-wall	صبغة جدار الخلية
differential	صبغة تفريقية
endospore	صبغة الجراثيم الداخلية
flagella	صبغة الفلاجلا (السوط)
Gram	صبغة جرام
indirect	صبغة غير مباشرة
negative	صبغة سالبة
positive	صبغة مباشرة (موجبة)
simple	صبغة بسيطة
structural	صبغة تركيب الخلية
Stains and reagents	صبغات ومحاليل
Standard analysis of water	التحليل القياسى للماء
Standard plate-count agar	بيئة آجار العد القياسية بالأطباق
Staphylococcus	جنس استافيلوكوكس
S. aureus	استافيلوكوكس أوريس
S. epidermidis	استافيلوكوكس إيبيدرميدس
S. saprophyticus	استافيلوكوكس سابروفيتيكس
Starch agar	آجار النشا
Starch hydrolysis	التحلل المائى للنشا
Starch indicator	دليل النشا
Starter cultures	بادئ (مزارع البادئات)
Sterifil apparatus	جهاز استريفيل لتحليل الهواء
Sterigmata	استرجماتا

Sterile conditions	ظروف معقمة
Sterilization of media	تعقيم البيئات
Sterilization methods	طرق التعقيم
dry heat	التعقيم بالحرارة الجافة
filtration	التعقيم بالترشيح
gaseous	التعقيم الغازى
intermittent	التعقيم المتقطع
irradiation	التعقيم بالإشعاع
steam under pressure	التعقيم بالبخار تحت ضغط
Stock culture agar	بيئة آجار حفظ المزارع
Streak plate	الأطباق المخطوطة
Streptococcus	جنس إستربتوكوكاس (بكتيريا)
S. faecalis	إستربتوكوكاس فيكاليس
S. lactis	إستربتوكوكاس لاكتس
S. mitis	إستربتوكوكاس ميتس
S. pneumoniae	إستربتوكوكاس نيمونيا
S. pyogenes	إستربتوكوكاس بيوجينس
Streptomyces	جنس استربتوميسس (بكتيريا)
S. griseus	إستربتوميسس جريسيس
Streptomycin-resistant mutant, isolation of	**طفرة مقاومة للإستربتوميسس ـــ عزلها**
Structural stains	**صبغات فحص تراكيب الخلية**
Sucrose	**سكروز**
Sulfa drugs	**أدوية السلفا**
Sulfanilamide	**سلفانيلاميد**
Sulfanilic acid reagent	**محلول حامض السلفانيليك**
Sulfide compounds as electron donors	**الكبريتيدات كمانح للإلكترونات**
Sulfide production	**إنتاج الكبريتيد**
Swiss cheese	الجبن السويسرى
Symbiosis	التكافل
Syntrophism	تعاون اختيارى
T_2 bacteriophage	الفاج البكتيرى من سلالة T_2
TDA agar (DNase test agar)	بيئة آجار اختبار إنزيم ال DNase
Tech agar	بيئة آجار Tech لدراسة السيدوموناس
Temperature effects	تأثير الحرارة
on growth	تأثير الحرارة على النمو
maximum	درجة الحرارة القصوى

minium	درجة الحرارة الدنيا
optimum	درجة الحرارة المثلى
Tetracycline	تتراسكلين (مضاد حيوى)
Thermophiles	ميكروبات محبة للحرارة العالية
Thiobacillus	جنس ثيوباسلس
T. thiooxidans	ثيوباسلس ثيواكسيدانس
Thioglycollate medium	بيئة الثيوجليكولات
Thiothrix	جنس ثيوثركس (بكتيريا)
Throat flora, normal	المجموعة الميكروبية للحلق ــ الطبيعية
Thrush	مرض القلاع ــ مرض الثرش (يصيب الحلق)
Thymol blue	ثيمول بلو (دليل)
Tissue culture medium	بيئة مزارع الأنسجة
Tissue culture techniques	طريقة زراعة الأنسجة
Tobacco mosaic virus (TMV)	فيروس موزايك الدخان (الطباق)
Tobacco plants	نبات الدخان (الطباق)
Toluidine blue O	توليودين بلو أو
Total coliforms	بكتيريا القولون الكلية
Transduction	الاستقطاع
Transformation medium	بيئة التحول الوراثى
Transmittance, percent transmission	النفاذية ، النسبة المئوية للضوء النافذ
Treponema pallidum	تريبونيما باليدم (بكتيريا)
Trichophyton	فطر ترايكوفيتون
Triglycerides	الجلسريدات الثلاثية
Triple-sugar iron agar	بيئة آجار ثلاثية السكريات مع الحديد
Trisaccharides	السكريات الثلاثية
Tris medium for phosphatase assay	بيئة تريس للتقدير البيولوجى للفوسفات
Trommsdorf's solution	محلول ترومسدورف
"True" yeast	خميرة حقيقية
Trypticase-soy media	بيئة تربتيكاز والصويا
Tryptone broth	مرق التربتون
Tryptophan	تربتوفان
Tryptose-blood agar (blood agar)	بيئة آجار تربتوز الدم (بيئة آجار الدم)
Tuberculosis	مرض السل
Turbidimetry	قياسات العكارة
Turbidity	العكارة
Turgor	انتفاخ الخلية الطبيعى
Tyndallization	التعقيم المتقطع

Tyrosine broth	مرق (بويون) التيروسين
Ultraviolet (UV) radiation	أشعة فوق بنفسجية
Umbonate colony	مستعمرة لها بروز مرتفع
Undulate colony	مستعمرة مموجة الحافة
Urea broth	مرق اليوريا
Urea hydrolysis (urease test)	تحلل اليوريا (اختبار اليورياز)
Variation	تغير
Vaspar	فاسبار
Vegetative mycelium	ميسليوم خضرى
Vegetative phage	فيروس خضرى (نشط)
Versenated plasma	بلازما ناتجة عن دم معامل بالفرسنات
Vibrio anguillarium	فبريو انجيلاريوم (بكتيريا)
Virion	فيريون (حبيبة الفيروس)
Virtual image	صورة تقديرية
Virus culture	مزرعة فيروس
Virus enumeration	عد الفيروسات
Vitamin assay	التقدير البيولوجى للفيتامين
Voges-Proskauer medium (MR-VP broth)	بيئة فوجز — بروسكاور (مرق MR - VP)
Vortex mixer	خلاط فورتكس
Water, microbiology of	ميكروبيولوجيا المياه
Water analysis	تحليل المياه
membrane filter technique	تحليل المياه بطريقة المرشح الغشائى
standard	تحليل المياه بالطريقة القياسية
Wet preparation	تحضير مبتل
Widal test	اختبار فيدال
Wines	نبيذ
Winkler and DeHaan minimal broth	مرق كفاف بيئة ونكلر وديهان
Winogradsky column	عمود فينوجرادسكى
Working distance	مسافة التشغيل
Wright's stain	صبغة رايت
Xylan	زيلان
Xylol	زيلول
Xylose	سكر زيلوز
Yeast-extract tryptone medium	بيئة مستخلص الخميرة والتربتون
Yeasts	الخمائر
Yeast spores	جراثيم الخميرة
Zygospores	جراثيم زيجية

رقم الإيداع / ٢٨٠٩ / ٨٩

× ١٠
العينية

العدسات الشيئية

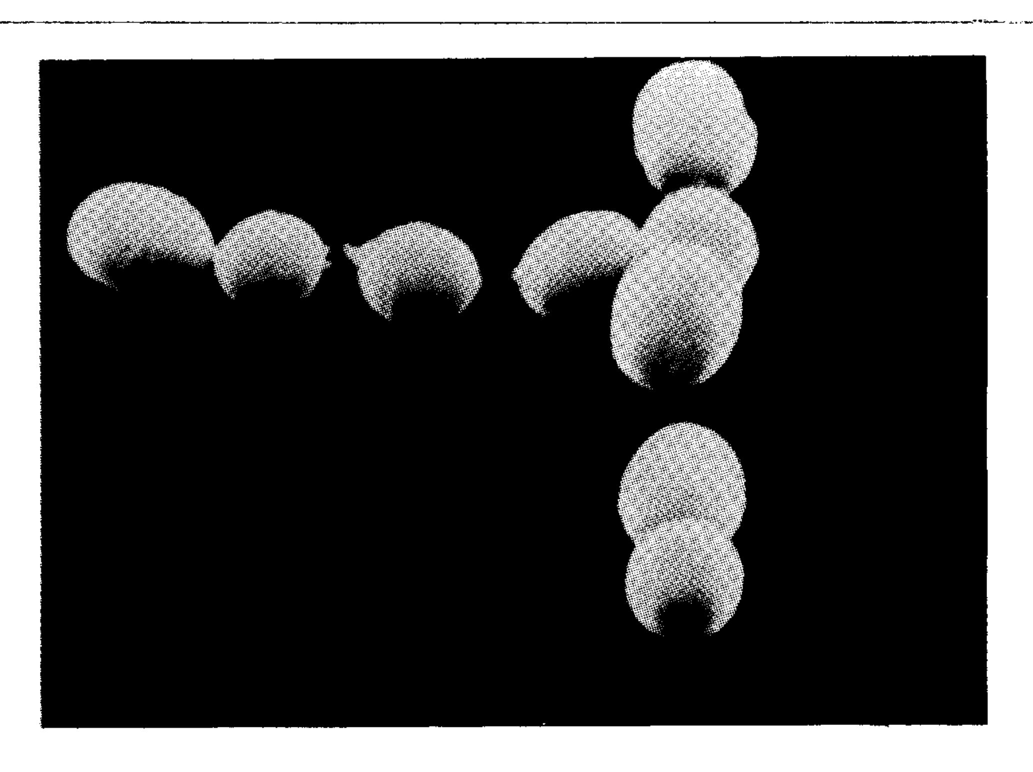
١٦ م
× ١٠
٥ م

٤ م
× ٤٤
٤٦ر٠ م
مسافة التشغيل

٨ر١ م
× ٩٥
١٣ر٠ م
مسافة التشغيل

الحجاب القزحى

شكل (١ - ٢)



شكل (١)

تصويب الأخطاء

رقم الصفحة	السطر	الخطأ	التصويب
٢٦	٢	Microtesin action	(تحذف)
٢٦	٣	ـورة الشبكية	صورة الشبكية
٢٧	تحت سطر ١٠	شكل (١ ــ ٢) ناقص	الشكل مرفق
٣٤	١	M- السوطيات RR	السوطيات
٤٩	٧ من أسفل	١×ــ ١٠ــ٦ متر	١×١٠ــ٦ متر
٧٢	٣	للصبغ القاعدى	للصبغ الأساسى
١٢٣	٣	ENIVIRONMENTAL	ENVIRONMENTAL
١٢٩	٦ من أسفل	Chrysogenm	*Chrysogenum*
١٥٢	أسفل الرسم	لا يوجد عنوان للشكل	شكل (٢): طريقة التخفيف للتنشيط الضوئى بعد المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية
١٦٨	٣	$C_{12} H_{32} O_{16}$	$C_{18} H_{32} O_{16}$
١٧١	١	أيون	لون
٢٠٠	تحت جدول (١)	ناقص المصدر	من : Levine, 1921, Iowa, Eng. Exp.Sta. Bull. No. 62.
٢٠٤	٥ من أسفل	ـونى أو عصو	حلزونى أو عصو
٢١٧	٥، ٦	Accalomirobium	Ancalomirobium
		Sphaerotillus	Spaerotilus
٢٢١	٧	فوق الجرثومة	القريب من الجرثومة
٢٢٩	بعد السطر الثانى	شكل (١) ناقص	الشكل مرفق
٢٤٧	١١، ١٢	Pratein	Protein
٢٧١	٧	البعلوم	البلعوم
٢٩٧	٤ من أسفل	لقح	حضن
٣٤٣	٨	anguillariun	*anguillarium*
٣٨٢	١٠	$M_g SO_4 . H_{20}$	$M_g SO_4 \cdot 7H_{20}$
٤٤٩	٦	البقاء ، البقاء	الخلايا الناجية ، الخلايا الناجية
٥٤١	٤	العدد	عدد
٥٥٣	٨	A النشدرة ON	النشدرة
٥٩٣	١٥	FOO	F+
٥٩٤	١	FS FC ratio	FC/FS ratio
٥٩٨	١٧	Mn SO	$Mn SO_4$